



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

Relación entre Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en genes implicados en la proliferación celular, adhesión y mecanismos de supervivencia y la susceptibilidad al desarrollo del cáncer de mama.

Lic. Karina Beatriz Acosta

Director: Dr. Pedro Darío Zapata

Codirectora: Dra. Susana Beatriz Etcheverry

Año 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Relación entre polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes implicados en la proliferación celular, adhesión y mecanismos de supervivencia y la susceptibilidad al desarrollo del cáncer de mama.

Lic. Karina Beatriz Acosta

2016

La presente Tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Pedro Darío Zapata y la codirección de la Dra. Susana Beatriz Etcheverry en el Laboratorio de Biotecnología Molecular perteneciente al Instituto de Biotecnología Molecular "*Dra María Ebe Reza*" (InBioMis) para optar al Grado Académico de *Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas* por la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. La misma ha sido posible gracias a la adjudicación de las Becas de Postgrado Tipo I y II otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al financiamiento de los siguientes proyectos:

- Variabilidad genómica y cáncer II: Nuevas tecnologías biomédicas para el estudio de SNPs y metilación. Programa de incentivos UNaM CIDET 16Q496 (Res CD N° 160/12).
- Variabilidad genómica y cáncer I: Impacto del polimorfismo en genes de la vía del folato, la fosfotirosina fosfatasa SHP-1, el receptor para EGF sobre el cáncer de mama y próstata. Programa de incentivos UNaM CIDET 16Q433 (Res CD N° 286/10).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han brindado apoyo y colaboración a lo largo de la realización de este trabajo:

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, principalmente al Departamento de Ciencias Biológicas, por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis.

A los directores del Laboratorio de Biotecnología Molecular y del InBioMis Dres. Pedro Zapata y Laura Villalba; por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y de sus proyectos; principalmente por el apoyo en el desarrollo de esta tesis.

A mi Director de tesis, Dr. Pedro Zapata, por las oportunidades brindadas, la confianza, el acompañamiento en la ejecución de este trabajo y la motivación constante.

A mi Codirectora, Dra. Susana Etcheverry, por recibirme en su Facultad y acompañarme, GRACIAS por su apoyo, atención y gran generosidad siempre. A su becario, Ignacio, por su ayuda y orientación.

A la gran familia del laboratorio BiotecMol-INBIOMIS, a los viejos y nuevos integrantes; con quienes comparto muchas horas al día y hacen del laboratorio un lugar estimulante para la investigación. Por los mates, las charlas, por las experiencias compartidas y los buenos momentos.

Particularmente, a mis compañeros de trabajo: Maria, Lucre, Marcelita, Romi, Silvana, Gus, Loli, Dani, Gabi, Merce, Martín, Pao, Pampi, Adri, Sabi y Cristian, por ayudarme a transitar este camino, por el compañerismo y la amistad de cada uno de ustedes.

A mis "pupilas" colegas: Paula Marks, Melina Lorenzini y Sabina Esnarriaga, por su colaboración en la realización de este trabajo, la buena predisposición y por contribuir a mi formación académica y personal.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones por darme la posibilidad de formar parte de su claustro docente y por apostar al crecimiento de institutos de investigación como el INBIOMIS (Instituto de Biotecnología Misiones Dra. Maria Ebe Rea) contribuyendo así a la formación constante de recursos humanos.

Mi especial agradecimiento a MI FAMILIA: mi mama, mi papá y mis hermanos, por el amor, apoyo incondicional y por acompañarme siempre.

A todos muchas gracias!!!

A mis padres: Raquel y Raúl.

°C: Grados centígrados.

A: Adenina.

ADN: Ácido Desoxiribonucleico.

Ala (A): Alanina

Arg (R): Arginina

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

BH: dominio de homología a Bcl-2

C: Citocina.

CVC: Consistencia de validación cruzada.

Cys (C): Cisteína

Del: deleción

dNTPs: cualquier base (A, T, C y G) de desoxiribonucleicos trifosfato.

EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Fn: dominio de fibronectina

Fr: Frecuencia

fs: frame shift (=cambio de marco de lectura)

g: gramos.

G: Guanina.

Glu (E): Glutamato

h: horas

HD: Hemidesmosomas

HER2: Receptores del factor de crecimiento epidermal humano-2.

His (H): Histidina

IARC: International Agency for Research on Cancer (=Agencia internacional para la investigación en cáncer).

IC: Intervalos de confianza.

Ile/Iso (I): Isoleucina

ITG: Integrina.

Kb: Kilo pares de bases.

Leu (L): Leucina

LV: Invasión linfovascular.

Lys (K): Lisina

MDR: Multifactor Dimensionality Reduction (=Reducción de la dimensionalidad multifactorial).

min: minutos.

mL: mililitro.

mM: miliMolar.

N: Número de individuos.

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos.

nm: nanómetro.

OR: Odds Ratio (=razón de proporciones)

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PH: dominio de homología a plectina

PI3Ks: Proteínas fosfatidilinositol 3-quinasas.

PM: Peso molecular.

pmoles: picomoles.

RE: Receptores de estrógeno.

RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.

RP: Receptores de progesterona.

RTKs: Receptores Tirosina Quinasas

s: segundos.

Ser (S): Serina

SH2: dominio de homology a Src 2

SNP: Polimorfismos de nucleótido simple.

SNPsn: polimorfismos de nucleótido simple no sinónimos

T: Timina.

TA: Testing Accuracy (=prueba de precisión).

TBE: Tris-Borato-EDTA

Thr (T): Treonina

Trp (W): Triptófano

UTR: Región no traducida del ARNm.

UV: Ultravioleta.

V: Volt.

Val (V): Valina

X₂: Prueba de chi-cuadrado.

µL: microLitro.

µM: microMolar.

En Argentina, el carcinoma mamario es responsable de aproximadamente el 20% del total de defunciones causadas por tumores malignos. Particularmente en la provincia de Misiones, al año se diagnostican en promedio 300 mujeres con tumores mamarios y del total de defunciones causadas por tumores cerca de 80 fallecen por cáncer de mama, lo cual representa un 14,8% de las misioneras. Por lo tanto, este carcinoma se ha transformado en una importante causa de morbimortalidad en nuestro país. En la actualidad se han descrito una gran variedad de mutaciones y polimorfismos que afectan esencialmente a protooncogenes y genes supresores de tumor implicados en la susceptibilidad al desarrollo del cáncer. Dada la importancia de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en enfermedades complejas como el cáncer, es posible determinar mediante estudios de asociación si existe relación entre los polimorfismos y la carcinogénesis, modulando la susceptibilidad a esta patología.

El objetivo general del trabajo fue analizar la contribución de los SNPs y mutaciones puntuales presentes en genes implicados en la proliferación celular, la adhesión y mecanismos de supervivencia, en la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama. Para llevar a cabo este objetivo, se analizaron un total de 87 muestras de carcinoma mamario (casos) y 125 muestras sin cáncer (controles). En primera instancia se determinó la presencia de polimorfismos y mutaciones en los genes: *HER2*, *ITGa6*, *ITGβ4*, *PIK3CA*, *AKT1*, *BCL2* y *BAX*, en casos y controles. La genotipificación de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) se llevó a cabo mediante la técnica de PCR-RFLP y PCR-secuenciación. Se compararon los niveles de variabilidad genética observados en ambos grupos, se evaluó la contribución de cada polimorfismo a la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama, así como su efecto combinado en el fenotipo de la patología mediante análisis estadísticos.

Los resultados obtenidos mostraron una asociación entre el cáncer de mama y la presencia de polimorfismos en genes implicados en la proliferación celular (H1047R de *PI3KCA*) y la apoptosis (-248G>A de *Bax* y -398C>A de *Bcl2*). Particularmente, el genotipo heterocigota AG (His/Arg) para la mutación *hotspot* H1047R de *PIK3CA* aumentaría hasta 20 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres portadoras del mismo. Este riesgo se incrementaría hasta 25 veces por la presencia de cualquiera de las dos variantes G ó T (Arg ó Leu) en la posición 1047. Además, el análisis de haplotipos mostró que los individuos que heredan los haplotipos (GGG y GGK) portadores de las variantes G y K en la posición 1047, presentan entre 17-18 veces más probabilidad de desarrollar cáncer de mama que aquellos que no lo presentan, ratificando el riesgo observado en el análisis de los genotipos por separado. De manera similar, el polimorfismo -938C>A en el promotor de *Bcl2*, mostró una asociación significativa con la susceptibilidad de desarrollar de cáncer de mama. La

presencia de esta variante aumentaría en un 70% el riesgo de desarrollar cáncer de mama respecto de aquellos individuos que no lo presentan. Además, este riesgo aumentaría de acuerdo al número de copias del alelo variante (A), de manera que los homocigotas (AA) tienen más riesgo que los heterocigotas (CA). Este riesgo sería más evidente en mujeres menores de 55 años, con invasión linfovascular positiva, receptor de HER2 negativo, grado histológico II y periodo menopáusico sin distinción (pre y post-menopáusico). Por el contrario, el análisis de asociación del SNP -248G>A de *BAX* mostró que los individuos portadores de 2 copias del alelo variante (AA) presentan una probabilidad menor al 20% de desarrollar cáncer de mama a diferencia de los heterocigotas que portan una sola copia (GA). De modo que este SNP estaría actuando como un factor protector, confiriendo una menor susceptibilidad frente al desarrollo de esta neoplasia, principalmente en mujeres homocigotas (AA) que presentan invasión linfovascular positiva; receptores de progesterona y estrógeno positivos; receptor HER2 negativo y grado histológico II. Por otra parte, los polimorfismos I655V del gen *HER2*; A380T del gen *ITGa6*; E542K y E545K de *PIK3CA* no mostraron asociación con el desarrollo de cáncer de mama. Así mismo, no se identificaron individuos portadores de las variantes W452C de *HER2*, R1281W de *ITGβ4* y E17K de *AKT1* en la población de mujeres estudiadas. Por último, el análisis de los polimorfismos a través del algoritmo MDR reveló que existe interacción entre ellos. El modelo de cuatro-factores (cuatro-loci) conformado por *HER2-ITGa6-BAX-BCL2* fue estadísticamente significativo (TA=0,81; p<0,05), y el valor positivo de entropía, estaría indicando que existe una interacción sinérgica entre éstos en relación al riesgo de desarrollar cáncer de mama.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se observa que la asociación encontrada entre los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) y el cáncer de mama apoyan el rol modificador de la susceptibilidad genética de los individuos en la etiología de dicha patología. Por lo tanto, los polimorfismos asociados a genes implicados en la proliferación celular y la apoptosis, tendrían una potencial utilidad como biomarcadores genéticos para la identificación de individuos con una susceptibilidad diferencial de desarrollar cáncer de mama.

CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	
PARTE I: Cáncer	
1.1. Generalidades del cáncer	2
1.1.1. Apoptosis y cáncer	3
1.2. Cáncer de mama	4
1.2.1. El cáncer de mama en el mundo, en Argentina y en Misiones.....	5
1.3. Marcadores y subtipos de cáncer de mama	7
PARTE II: Carcinogénesis asociada a vías de proliferación, adhesión celular y supervivencia.	
1.4. Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano: HER-2	8
1.5. Integrina $\alpha\beta4$	10
1.5.1. Estructura y funciones de la Integrina $\alpha\beta4$	11
1.6. Proteínas fosfatidilinositol 3-quinasas: PI3Ks.....	12
1.6.1. Vía de señalización de PI3K y activación en cáncer	13
1.7. AKT/PKB (Proteína Kinasa B).....	15
1.8. Familia de proteínas BCL-2: Bcl-2 y Bax.....	16
PARTE III: Relación entre variantes genéticas y carcinogénesis	
1.9. Variantes genéticas y enfermedad.....	18
1.9.1. Polimorfismos en el gen <i>HER2</i> : W452C y I655V.....	19
1.9.2. Mutaciones en los genes <i>ITGA6</i> e <i>ITGB4</i>	20
1.9.3. Mutaciones <i>hotspot</i> en el gen <i>PIK3CA</i>	21
1.9.4. Mutación E17K en <i>AKT</i>	23
1.9.5. Polimorfismos en los promotores de los genes <i>BAX</i> y <i>BCL-2</i>	24
1.10. Análisis descriptivo de polimorfismos	25
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. ANÁLISIS GENÉTICO.....	29
3.1.1. Selección de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) y mutaciones puntuales.....	29
3.1.2. Características del estudio, selección de las muestras y extracción de ADN.....	29
3.1.2.1. Características del estudio	29
3.1.2.2. Selección de muestras	30

3.1.2.3. Extracción de ADN	31
3.1.3. Obtención de cebadores y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	31
3.1.3.1. Obtención de cebadores	31
3.1.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	33
3.1.4. Análisis de variantes genéticas mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)	34
3.1.4.1. Selección de enzimas de restricción	34
3.1.4.2. Análisis de restricción.....	35
3.1.5. Análisis de mutaciones mediante PCR-secuenciación.....	36
3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
3.2.1. Frecuencias genotípicas y génicas	37
3.2.2. Análisis de asociación.....	38
3.2.2.1. Análisis de Haplotipos.....	40
3.2.3. Estimación del efecto combinado de las variantes genéticas en el fenotipo del cáncer de mama.....	40
3.2.3.1. Efectos epistáticos	41
4. RESULTADOS	
4.1. ANÁLISIS GENÉTICO.....	44
4.1.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	44
4.1.2. Análisis de variantes genéticas mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)	46
4.1.2.1. Polimorfismos en <i>HER2</i>	46
4.1.2.1.1. SNP W452C	46
4.1.2.1.2. SNP I655V	46
4.1.2.2. Polimorfismos en <i>ITGα6β4</i>	47
4.1.2.2.1. SNP A380T de <i>ITGa6</i>	47
4.1.2.2.2. Mutación R1281W de <i>ITGβ4</i>	48
4.1.2.3. Mutaciones <i>hotspots</i> en <i>PIK3CA</i>	49
4.1.2.3.1. Mutación E542K.....	49
4.1.2.3.2. Mutación E545K.....	50
4.1.2.3.3. Mutación H1047R.....	50
4.1.2.4. Mutaciones E17K en <i>AKT1</i>	51
4.1.2.5. SNP -248G>A de <i>BAX</i>	51
4.1.2.6. SNP -938C>A de <i>BCL-2</i>	52

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
4.2.1. Frecuencias genotípicas y estimación del riesgo de susceptibilidad de desarrollo de cáncer de mama	52
4.2.1.1. SNP W452C de <i>HER2</i> y mutación R1281W de <i>ITGβ4</i>	52
4.2.1.2. SNP I655V de <i>HER2</i>	53
4.2.1.3. SNP A380T de <i>ITGa6</i>	55
4.2.1.4. Mutación E542K de <i>PIK3CA</i>	57
4.2.1.5. Mutación E545K de <i>PIK3CA</i>	58
4.2.1.6. Mutación H1047R de <i>PIK3CA</i>	60
4.2.1.6.1. Análisis de haplotipos de las mutaciones hotspots de <i>PIK3CA</i> y su asociación con el cáncer de mama.	62
4.2.1.7. Mutación E17K de <i>AKT1</i>	63
4.2.1.8. SNP -248G>A de <i>Bax</i>	64
4.2.1.9. SNP -938C>A de <i>Bcl-2</i>	66
4.2.2. Estimación del efecto combinado de las variantes genéticas en el fenotipo del cáncer de mama.....	68
4.2.2.1. Estimación de la interacción entre todos los SNPs estudiados	68
5. DISCUSIÓN	
5.1. Alteraciones en vías de señalización celular y el cáncer de mama	73
5.2. Polimorfismos De Nucleótido Simple y su relación con el cáncer de mama	76
5.2.1. Polimorfismos I655V y W452C de <i>HER2</i>	76
5.2.2. Polimorfismo A380T de <i>ITGa6</i> y la mutación R1281W de <i>ITGβ4</i>	79
5.2.3. Mutaciones hotspots en los exones 9 y 20 de <i>PIK3CA</i>	80
5.2.4. Mutación E17K del gen <i>AKT1</i>	82
5.2.5. Polimorfismos en los promotores de <i>Bax</i> y <i>Bcl2</i>	83
5.3. Diferencias entre los estudios de asociación	85
5.4. Interacciones génicas en el cáncer de mama	87
5.5. Importancia de los estudios de asociación y perspectivas futuras	89
6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFÍA	96
8. ANEXO	115

FIGURAS

Figura 1. Anatomía de una glándula mamaria normal.	4
Figura 2. Distribución mundial de los distintos tipos de cáncer en mujeres.....	6
Figura 3. Incidencia, mortalidad y prevalencia de los distintos tipos de cáncer en mujeres, en Argentina.....	6
Figura 4. Familia de receptores tirosina quinasa ErbB/HER.....	9
Figura 5. Organización estructural de un hemidesmosoma tipo I.....	11
Figura 6. Diferencias entre las clases de PI3K.....	13
Figura 7. Diagrama de p110 α	13
Figura 8. Relación de la vía de PI3K y el desarrollo del cáncer	14
Figura 9. Regulación de la señal de AKT activada.....	16
Figura 10. Dominios estructurales de la familia BCL-2	16
Figura 11. Mecanismo de activación/inhibición de Bax	17
Figura 12. Esquema de la estructura génica y proteica de HER2.....	20
Figura 13. Esquema de la estructura de $\beta 4$	21
Figura 14. Gen <i>ITGA6</i> y ARNm.	21
Figura 15. Estructura y ubicación cromosómica del gen <i>PIK3CA</i>	21
Figura 16. Mutaciones en <i>PIK3CA</i>	22
Figura 17. Esquema de la estructura génica y proteica de AKT1.....	23
Figura 18. Esquema del gen <i>Bcl-2</i>	24
Figura 19. Esquema del gen <i>Bax</i>	25
Figura 20. Resumen de los pasos involucrados en la implementación del método MDR.....	41
Figura 21. Gráfico y dendograma de interacción construido por MDR.....	42
Figura 22. Resultados de amplificación de las 9 regiones de interés	45
Figura 23. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio del SNP W452C de <i>HER2</i>	46
Figura 24. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciaciones para el estudio del SNP I655V de <i>HER2</i>	47
Figura 25. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciaciones para el estudio del SNP A380T de <i>ITGa6</i>	48
Figura 26. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio del SNP R1281W de <i>ITG$\beta 4$</i>	49
Figura 27. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio de la mutación <i>hotspot</i> E542K.....	49
Figura 28. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio de la mutación <i>hotspot</i> E545K.....	50

Figura 29. Electroferogramas de los 3 genotipos de H1047R observados en la población analizada	50
Figura 30. Electroferogramas de los genotipos de E17K observados en la población analizada	51
Figura 31. Patrón de bandas obtenido de la digestión con <i>TauI</i> y perfil de secuenciaciones para el estudio del SNP -248 G>A de <i>Bax</i>	51
Figura 32. Patrón de bandas obtenido de la digestión con <i>BclI</i> y perfil de secuenciaciones para el estudio del SNP -938 C>A de <i>Bcl-2</i>	52
Figura 33. Resultados del análisis de MDR para las interacciones genotípicas de los SNPs en estudio y su asociación con el cáncer de mama.	69
Figura 34. Gráfico de interacción de los SNPs en estudio.	70
Figura 35. Dendograma de interacción construido por el MDR.	71
Figura 36. Vía de señalización implicada en la proliferación, adhesión y mecanismos de supervivencia.	7

TABLAS

Tabla 1. SNPs y mutaciones seleccionados para el presente trabajo	29
Tabla 2. Características demográficas y clínico-patológicas de los individuos con cáncer de mama.....	30
Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificación de las regiones de interés de los genes en estudio.....	32
Tabla 4. Condiciones de PCR específica para cada region de interés	33
Tabla 5. Enzimas de restricción seleccionadas para la identificación de 8 SNPs mediante el programa <i>NEBcutter</i>	34
Tabla 6. Condiciones de restricción utilizadas para cada variante	35
Tabla 7. Interpretación de los resultados obtenidos a partir de las digestiones enzimáticas ..	35
Tabla 8. Posición de variantes vecinos a los SNPs en estudio.....	37
Tabla 9. Distribución de casos y controles para el análisis de asociación.....	38
Tabla 10. Codificación de variables indicadoras para evaluar diferentes modelos de herencia	39
Tabla 11. Número total de muestras analizadas para cada polimorfismo/mutación en estudio.	44
Tabla 12. Análisis del riesgo del polimorfismo I655V (A>G) en función del modelo de herencia.	53

Tabla 13. Distribución de las frecuencias alélicas del polimorfismo I655V de <i>HER2</i> entre individuos con cáncer de mama y controles	54
Tabla 14. Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de I655V y el riesgo de cáncer de mama	54
Tabla 15. Análisis del riesgo del polimorfismo A380T (G>A) en función del modelo de herencia.....	55
Tabla 16. Distribución de las frecuencias alélicas del polimorfismo A380T de <i>ITGA6</i> entre individuos con cáncer de mama y controles.	56
Tabla 17. Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de A380T y el riesgo de cáncer de mama.....	56
Tabla 18. Análisis del riesgo de la mutación E542K (G>A) en función del modelo codominante	57
Tabla 19. Distribución de las frecuencias alélicas de la mutación E542K de <i>PIK3CA</i> entre individuos con cáncer de mama y controles.	57
Tabla 20. Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de E542K y el riesgo de cáncer de mama	58
Tabla 21. Análisis del riesgo de la mutación E545K (G>A) en función del modelo codominante.....	59
Tabla 22. Distribución de las frecuencias alélicas de la mutación E545K de <i>PIK3CA</i> entre individuos con cáncer de mama y controles.	59
Tabla 23. Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de E545K y el riesgo de cáncer de mama	59
Tabla 24. Análisis del riesgo de la mutación <i>H1047R</i> (A>G) en función del modelo de herencia.....	60
Tabla 25. Distribución de las frecuencias alélicas de la mutación <i>H1047R</i> de <i>PIK3CA</i> entre individuos con cáncer de mama y controles..	61
Tabla 26. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de la mutación <i>H1047L</i> de <i>PIK3CA</i> entre individuos con cáncer de mama y controles.	61
Tabla 27. Análisis del riesgo de la mutación <i>H1047R/L</i> (A>K*) en función del modelo de herencia.....	61
Tabla 28. Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de <i>H1047R</i> y el riesgo de cáncer de mama.....	62
Tabla 29. Análisis de haplotipos para las mutaciones E542K, E545K y <i>H1049R</i> y su asociación con el cáncer de mama.....	63
Tabla 30. Análisis de haplotipos para las mutaciones E542K, E545K y <i>H1049R/L</i> y su asociación con el cáncer de mama	63
Tabla 31. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de la mutación E17K de <i>AKT</i> entre individuos con cáncer de mama y controles... ..	64
Tabla 32. Análisis del riesgo del SNP -248 G>A de Bax en función del modelo de herencia..	64

Tabla 33. Distribución de las frecuencias alélicas del SNP -248 G>A de Bax entre individuos con cáncer de mama y controles	65
Tabla 34. Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de Bax y el riesgo de cáncer de mama.....	65
Tabla 35. Análisis del riesgo del SNP -938 C>A de Bcl2 en función del modelo de herencia....	66
Tabla 36. Distribución de las frecuencias alélicas del SNP -938 C>A de Bcl2 entre individuos con cáncer de mama y controles... ..	67
Tabla 37. Análisis de reducción de dimensión multifactorial (MDR).....	68

INTRODUCCIÓN

PARTE I: CÁNCER

1.1. Generalidades del cáncer

En condiciones fisiológicas, existe una estricta regulación genética de dos procesos opuestos: mitosis y apoptosis, para mantener la cantidad de células apropiada en cada tejido. El término “cáncer” hace referencia a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular desordenado y una colonización tisular, es decir, por una alteración en dicho equilibrio que puede deberse a una excesiva proliferación o a una reducida muerte celular (Luque Cabrera y Herráez Sánchez, 2002).

En la actualidad, se sabe que esta pérdida de regulación celular se debe principalmente a mutaciones genéticas que alteran las actividades normales de ciertos genes, ya sea por acción de carcinógenos o por errores en la replicación y reparación del ADN (Lodish *et al.*, 2005). Los dos grandes grupos de genes implicados en el inicio del cáncer, afectados por el daño genético y cuyos productos proteicos regulan la proliferación celular y la apoptosis son los protooncogenes y los genes supresores de tumores (Luque Cabrera y Herráez Sánchez, 2002). Los primeros se activan para volverse oncogenes por mutaciones que causan que el gen sea excesivamente activo en la promoción del crecimiento (ganancia de función) y los segundos moderan el crecimiento, por lo que su daño implica una pérdida de función (Luque Cabrera y Herráez Sánchez, 2002; Lodish *et al.*, 2005).

La carcinogénesis requiere que en una misma célula se produzca una acumulación gradual de numerosas alteraciones al azar en varios genes y es, por lo tanto, un proceso de pasos múltiples que puede dividirse en tres estadios principales denominados iniciación, promoción y progresión. Durante la iniciación las células normales se convierten a un estado pre-canceroso, es decir que este primer estadio involucra un cambio genético irreversible, generalmente una mutación en algún gen. La promoción está asociada con un aumento en la proliferación de las células iniciadas. La última etapa es la progresión tumoral, durante la cual las propiedades de las células tumorales cambian gradualmente, a medida que las mismas adquieren características que les confieren ventajas selectivas, por ejemplo mayores tasas de crecimiento e invasividad, habilidad para sobrevivir en el torrente sanguíneo y para crecer en otros órganos, resistencia a respuestas inmunes o a drogas, evasión de apoptosis, entre otras (Martínez *et al.*, 2003; Hardin *et al.*, 2011). Por lo tanto, la progresión es la acumulación de más alteraciones, tanto genéticas como epigenéticas, que llevan a la adquisición del fenotipo maligno o invasivo (Martínez *et al.*, 2003).

Es necesario hacer una distinción entre tumor y cáncer. Una célula que crece (aumenta su masa) y prolifera (se divide) más de lo normal producirá un tumor (Alberts *et al.*, 2008). Por lo tanto, un tumor es un crecimiento anormal de cualquier tejido mientras que cáncer hace referencia específicamente a tumores malignos (Schulz, 2007). Los tumores malignos se caracterizan por crecer y dividirse más rápidamente que las células normales, presentar tasas de mortalidad alteradas e invadir tejidos cercanos, un proceso denominado metástasis. Por el contrario, los tumores pequeños y localizados en una región de algún tejido se llaman tumores benignos, y se asemejan y hasta pueden funcionar como células normales (Lodish *et al.*, 2005). Entonces, la principal diferencia entre ambos es la capacidad invasiva de los tumores malignos (Martinez *et al.*, 2003).

Las alteraciones genéticas que surgen durante la oncogénesis perturban las propiedades fundamentales de la célula, confiriéndole el fenotipo tumoral (Lodish *et al.*, 2005). Las características principales que explican el comportamiento de las células tumorales se enumeran a continuación (Martinez *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2005; Schulz, 2007):

1. Inmortalización, potencial de replicación sin límites.
2. Proliferación celular aumentada, a menudo autónoma.
3. Alteración de adhesión celular, invasión de tejidos y metástasis.
4. Pérdida del control del ciclo celular, insensibilidad ante señales anti-crecimiento.
5. Evasión de apoptosis.
6. Inestabilidad genómica.
7. Angiogénesis.

1.1.1. Apoptosis y cáncer

El camino a la formación de tumores depende no solo de la habilidad de escapar del control del crecimiento sino también de la habilidad de prevenir la apoptosis (Brown *et al.*, 1996). La apoptosis se define como el conjunto de reacciones bioquímicas que tiene lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos (Iracheta, 2007). En este proceso se distinguen tres etapas:

- **Inducción:** es la reacción ante una señal, requiere estímulos adecuados (señales positivas), tanto extracelulares como procedentes de la propia célula o señales negativas que actúan en sentido contrario.

1. INTRODUCCIÓN

- Ejecución: alteraciones diversas que conducen a la muerte de la célula (disminución de tamaño celular, condensación, fragmentación, liberación de pequeños cuerpos apoptóticos limitados por membranas, el núcleo se condensa y el ADN se fragmenta).
- Fase Final de la Apoptosis: los cuerpos apoptóticos, protuberancias externas de la célula, son reconocidos y fagocitados por otras células, de forma que la célula se destruye sin que se llegue a liberar material celular al medio y sin la aparición de una reacción inflamatoria (Luque Cabrera y Herráez Sánchez, 2002; Luna-López *et al.*, 2008).

La muerte celular programada constituye un mecanismo de defensa mediante el cual las células alteradas, potencialmente peligrosas, son eliminadas del organismo (García y Vecino, 2003). Este proceso puede ser alcanzado mediante dos vías: una vía externa mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF) y la otra, intracelular, que se centra alrededor de la liberación del citocromo c por la mitocondria, siendo la familia BCL-2 uno de los principales reguladores (Martínez-Arribas *et al.*, 2008).

1.2. Cáncer de mama

Los distintos tipos de cáncer se clasifican según el tejido y el tipo de célula a partir del cual se originan. Así, los cánceres que tienen su origen en las células epiteliales, como el cáncer de mama, se denominan carcinomas (Alberts *et al.*, 2008).

La mama normal está formada por glándulas formadoras de leche (que corresponden a los lóbulos), por conductos que transportan la leche desde los lóbulos hasta el pezón y por estroma, que incluye a los vasos sanguíneos y linfáticos, tejido adiposo y conectivo¹ (Figura 1).

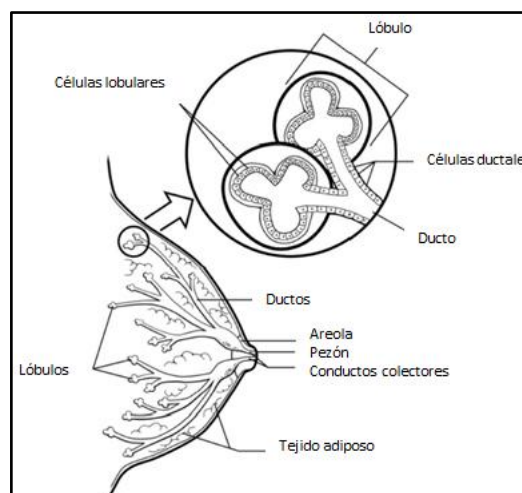


Figura 1. Anatomía de una glándula mamaria normal¹.

¹(<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/>).

El cáncer de mama es un tumor maligno que se ha desarrollado a partir de las células mamarias. Generalmente se origina en las células de los lóbulos, tomando el nombre de carcinoma lobular, o en los conductos, denominándose carcinoma ductal. El término carcinoma *in situ* se utiliza para estadios tempranos de cáncer, cuando el mismo está confinado en su lugar de origen. Por el contrario, un carcinoma invasivo o infiltrante es un cáncer que ya ha crecido y colonizado otros tejidos. Por lo tanto, el cáncer de mama puede clasificarse en¹:

- Carcinoma Lobular *In Situ* (CLIS): no representa un verdadero cáncer de mama sino una “neoplasia lobular”, es decir, una acumulación de células anómalas que aumentan el riesgo de que una persona desarrolle más adelante un cáncer de mama invasivo. El crecimiento anómalo permanece dentro de los lóbulos y aún no se propaga hacia los tejidos circundantes.
- Carcinoma Lobular Invasivo (CLI): El cáncer comenzó en los lóbulos productores de leche y comienza a invadir otros tejidos de la mama. Con el paso del tiempo, un carcinoma lobular invasivo puede propagarse hacia los ganglios linfáticos y a otras zonas del cuerpo.
- Carcinoma Ductal *In Situ* (CDIS): El cáncer comienza dentro de los conductos lácteos y no se propaga fuera del mismo.
- Carcinoma Ductal Invasivo (CDI): El cáncer se inicia en los conductos lácteos y se expande hacia los tejidos mamarios que lo rodean. Con el tiempo, el carcinoma ductal invasivo puede propagarse hacia los ganglios linfáticos y posiblemente a otras áreas del cuerpo.

1.2.1. El cáncer de mama en el mundo, en Argentina y en Misiones

El carcinoma mamario es el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y es además, la principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial (*American Cancer Society*, 2011) (Figura 2).

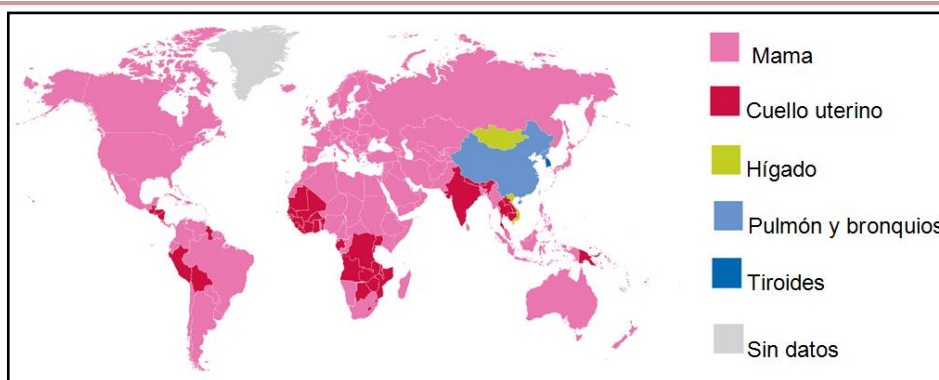


Figura 2. Distribución mundial de los distintos tipos de cáncer en mujeres, 2008
(Modificado de *American Cancer Society*, 2011).

Según los últimos informes de la base de datos de GLOBOCAN² (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) en 2012 más del 19% de todos los casos de cáncer diagnosticados en mujeres argentinas correspondían a carcinomas mamarios y aproximadamente el 6% de los mismos resultaban en mortalidad (Figura 3).

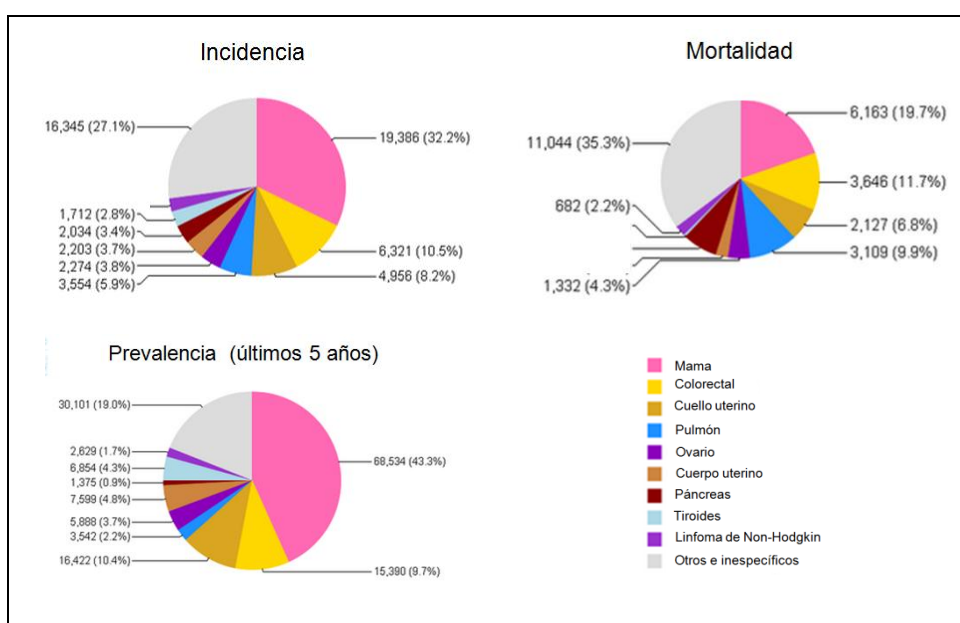


Figura 3. Incidencia, mortalidad y prevalencia de los distintos tipos de cáncer en mujeres, en Argentina. Informe 2012 (Modificado de Globocan).

Estos datos coinciden con los aportados por la Dirección de Estadística del Ministerio de Salud de la Nación, que indican que el cáncer de mama es el responsable de aproximadamente el 20% del total de defunciones causadas por tumores malignos en mujeres (Dirección de Estadística e Información de la Salud, 2013). Por lo tanto, en Argentina, el cáncer de mama se ha transformado en una importante causa de morbimortalidad.

² (<http://globocan.iarc.fr>)

Particularmente en la provincia de Misiones, por año se diagnostican en promedio 300 mujeres con tumores mamarios y del total de defunciones causadas por tumores cerca de 80 fallecen por cáncer de mama, lo cual representa un 14,8% (79/532) de las misioneras (Ministerio de Salud Pública del Gobierno de la Provincia de Misiones, 2014).

1.3. Marcadores y subtipos de cáncer de mama

Los marcadores tumorales son indicadores bioquímicos de la presencia de un tumor. Incluyen antígenos de superficie celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas y hormonas. Son constituyentes normales de la célula que se encuentran en bajas concentraciones en los tejidos de personas sanas y se alteran en pacientes que desarrollan tumores, ya sea porque el propio tumor las produce o porque promueve que el entorno lo haga. No suelen ser suficiente evidencia para determinar la existencia de un cáncer pero sí complementan el diagnóstico, permiten evaluar un tratamiento y detectar recidivas (Coronato *et al.*, 2002).

De acuerdo a la información que proveen, los biomarcadores pueden dividirse según su utilidad: diagnóstico, pronóstico, tratamiento y prevención. Los biomarcadores de diagnóstico, también llamados de predicción, son identificados por la caracterización de mutaciones claves y vías moleculares involucradas en el desarrollo y proliferación del tumor. Son útiles para optimizar las decisiones de la terapia a implementar, otorgando información sobre la probabilidad de respuesta a una intervención terapéutica. Los biomarcadores de pronóstico se identifican por mutaciones germinales somáticas, cambios en la metilación del ADN, niveles de microRNA (miRNA) y células circulantes de tumor (CTC) en sangre. Los biomarcadores de tratamiento y prevención requieren un análisis molecular más exacto para guiar la terapia individual, identificando pacientes con diferentes riesgos en la evolución de la enfermedad (como la recurrencia) (Nalejska *et al.*, 2014).

En cáncer de mama, dentro de los marcadores cuya utilidad está ampliamente comprobada se encuentran: el tamaño del tumor, estado de los ganglios, grado histológico, tipo histológico, los receptores hormonales: de estrógeno (ER) y de progesterona (PR) y el receptor tipo 2 para el factor de crecimiento epidérmico (HER2/neu también conocido ErbB-2). A su vez, el estado de receptor se utiliza para dividir el cáncer de mama en cuatro clases fundamentales (Sorlie *et al.*, 2003; Uribe *et al.*, 2010; Chacón y Costanzo, 2010; González del Río, 2011):

- A. Luminal A: ER +, PR + o -, HER2 -.
- B. Luminal B: ER +, PR +, HER2 +.
- C. No luminal: ER -, PR -, HER2 +.

D. Triple Negativo³: ER -, PR -, HER2 -.

Por otra parte, entre los marcadores genéticos más difundidos y utilizados se encuentran los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2*, ya que los portadores de mutaciones en estos genes suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. Aproximadamente el 5-10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios y de éstos, al menos el 30% es atribuido a mutaciones germinales en estos genes (Economopoulou *et al.*, 2015).

Con el transcurrir de los años, se descubren y validan nuevos biomarcadores que se van incorporando a la práctica clínica, brindando información importante acerca del comportamiento biológico de un tumor y la posible respuesta a la radio o quimioterapia y por lo tanto, orientan la terapéutica a implementarse. En este aspecto, el uso de un panel de marcadores tumorales, proporciona información más certera que la que puede suministrar un solo factor (Coronato *et al.*, 2002).

PARTE II: Carcinogénesis asociada a vías de proliferación, adhesión celular y supervivencia.

Se han identificado varias alteraciones estructurales y funcionales en genes que regulan diversas respuestas biológicas incluyendo la proliferación, diferenciación, motilidad celular y supervivencia, que están implicadas en el proceso de carcinogénesis (Eccles, 2001; Guo y Giancotti, 2004; Samuels *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

1.4. Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano: HER2.

Las vías de señalización mediadas por los Receptores Tirosina Quinasas (RTKs) generalmente se encuentran alteradas genética y epigenéticamente en numerosos tumores, dotando de una ventaja selectiva a las células cancerígenas y resultando en un mal funcionamiento de las vías de señalización (Paul y Mukhopadhyay, 2004).

³ El subtipo Basal like, basal epitelial o basocelular mencionado en la literatura se incluye en el subtipo Triple Negativo ya que no todos los triples negativos son Basal Like (Chacón y Costanzo, 2010).

1. INTRODUCCIÓN

La familia de receptores tirosina quinasa ErbB/HER está compuesta por cuatro miembros: receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4, siendo HER2 una de las isomorfias con especial importancia en cáncer de mama (Eccles, 2001). Todos los miembros de esta familia incluyen un dominio de unión extracelular, un dominio transmembrana y un dominio funcional de tipo tirosina quinasa (excepto HER3).

HER2 (también conocido como *erbB-2/neu*) es un protooncogén localizado en el cromosoma 17q21.1, se extiende en 38kb y comprende 27 exones que codifican una glicoproteína de transmembrana de 185kDa con actividad tirosina quinasa, la cual regula diversas respuestas biológicas incluyendo la proliferación, diferenciación, motilidad celular y supervivencia (Schechter *et al.*, 1984; King *et al.*, 1985; Coussens *et al.*, 1985; Bargmann *et al.*, 1986; Akiyama *et al.*, 1986; Hynes y Stern, 1994).

Al momento no se conoce un ligando fisiológico específico de HER2, sin embargo, se ha demostrado que la actividad tirosina kinasa puede ser inducida por la sobreexpresión de HER2 sin estimulación de un ligando (Prenzel *et al.*, 2001). La activación de HER2 requiere la homo o heterodimerización con otros miembros de la familia seguido de la autofosforilación y eventos de señalización corriente abajo, impulsando vías intracelulares tales como MAPK y PI3K/AKT (Frank *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2005) (Figura 4).

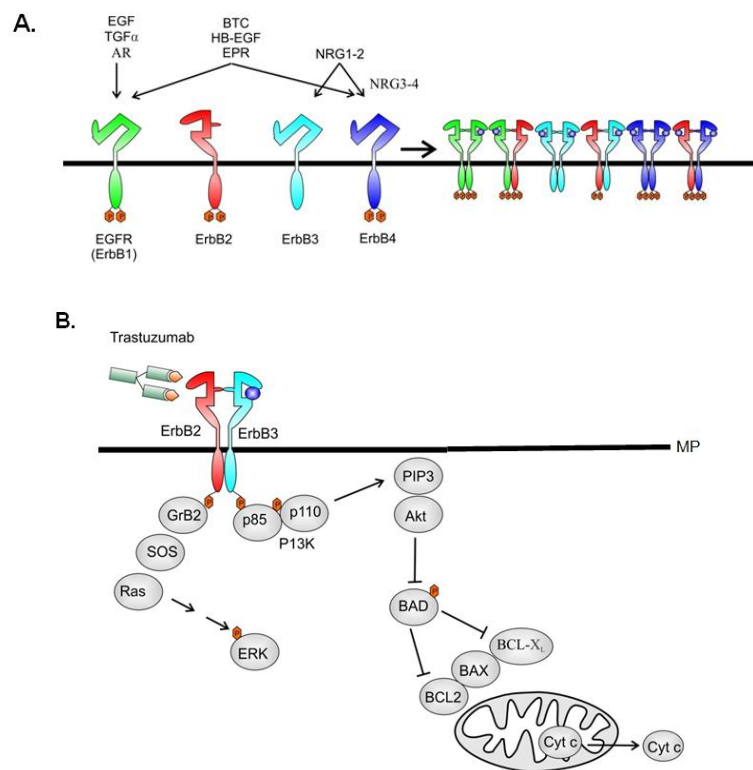


Figura 4. Familia de receptores tirosina quinasa ErbB/HER. A). Receptores tirosina quinasa ErbB/HER y sus ligandos. B). Mecanismo de señalización de ErbB e inhibición en células tumorales (Tomado y modificado de Hervent y Keulenaer, 2012).

La formación de heterodímeros de EGFR-HER2 resulta en un incremento en la afinidad por los ligandos (EGF: factor de crecimiento epidérmico; TGF α : factor de necrosis tumoral alfa; entre otros) y una actividad catalítica incrementada en comparación con los homodímeros de EGFR. En el caso de heterodímeros de HER2-HER3 y HER2-HER4, la afinidad por HRGs (heregulin, neuregulin) se incrementa y la actividad quinasa permite la señalización que no ocurre con la formación de homodímeros de HER3, ya que son catalíticamente inactivos. Este tipo de transactivación y la asociación prolongada a la membrana contribuiría a mantener la señalización intracelular (Sundaresan *et al.*, 1999; Harari y Yarden, 2000; Yarden y Sliwkowski, 2001).

Se han identificado varias alteraciones estructurales y funcionales en este receptor que están implicadas en el proceso de carcinogénesis (Marmor *et al.*, 2004). La proteína HER2 se encuentra frecuentemente expresada a niveles bajos en una variedad de células epiteliales adultas, sin embargo la activación aberrante de HER2 debido a la amplificación o sobreexpresión puede contribuir al arresto de la proliferación y desarrollo tumoral y/o progresión (Klapper *et al.*, 2000). Clínicamente, la amplificación o sobreexpresión de HER2 se ha asociado con tumores más agresivos y un pronóstico desfavorable en varios tumores, tal como cáncer de mama (Slamon *et al.*, 1987; Winstanley *et al.*, 1991), ovario (Slamon *et al.*, 1989; Berchuck *et al.*, 1990) y gástrico (Amadori *et al.*, 1997; Yonemura *et al.*, 1998).

1.5. Integrina $\alpha 6\beta 4$

Las integrinas son una familia de receptores transmembrana que ligan componentes de la matriz extracelular. Estos ligandos son isoformas de laminina en la membrana basal de los epitelios, importantes sustratos para la adhesión y migración de las células. Las integrinas son heterodímeros de distintas combinaciones de una subunidad alfa (α) y otra beta (β), cada uno con especificidades propias. En mamíferos, existen 18 subunidades α y 8 β que conforman 24 integrinas. Mediante dos grandes funciones: adhesiva y de transducción, participan en tareas esenciales para la célula como ser: anclaje, migración, supervivencia, proliferación, crecimiento y diferenciación celular (Chen *et al.*, 2009). Pueden activar diferentes vías de señalización, autónomas o asociadas a receptores tirosina quinasa. Transmiten señales químicas y mecánicas, polarizan la célula, organizando y remodelando el citoesqueleto (Guo y Giancotti, 2004). Las vías de señalización en las que participan también convergen con las mediadas por receptores de factores de crecimiento, proveyendo un mecanismo para modular el ciclo celular. De esta manera, al conectar la información

proveniente del ambiente extracelular con moléculas intracelulares, las integrinas son capaces de regular procesos muy diversos (Diaz *et al.*, 2005).

1.5.1. Estructura y funciones de la Integrina $\alpha 6\beta 4$:

La integrina $\alpha 6\beta 4$ se compone de la subunidad $\alpha 6$, codificada por el gen *ITGA6* (2q31.1) y la subunidad $\beta 4$, codificada por *ITGB4* (17q25). Se expresa principalmente en células epiteliales, endoteliales, de Schwann y tumorales (Bon *et al.*, 2007). Cumple un papel fundamental en el correcto desarrollo del sistema nervioso, interviniendo en la laminación y también en el mantenimiento de la integridad de los epitelios mediante interacciones célula-matriz (Georges-Labouesse *et al.*, 1998). Estas últimas se efectúan en el marco de estructuras multiproteicas denominadas uniones de anclaje o Hemidesmosomas (HD) (Tagliabue *et al.*, 1998). Existen HD de tipo I, los cuales se componen de integrina $\alpha 6\beta 4$, plectina citoplasmática y otras proteínas; y de tipo II, más rudimentarios, en el epitelio intestinal, que constan sólo de $\alpha 6\beta 4$ y plectina (Pereda *et al.*, 2009) (Figura 5).

Estructuralmente, $\alpha 6\beta 4$ se distingue de las demás integrinas por el dominio citoplasmático $\beta 4$, el cual cumple la mayoría de las funciones de la integrina y es mucho más largo que el de cualquier otra subunidad β (aprox. 1000 residuos). Se presenta en 4 isoformas funcionales, productos del *splicing* alternativo (Diaz *et al.*, 2005).

Además, consta de cuatro dominios fibronectina tipo III (FnIII). Su asociación con los filamentos intermedios de queratina, al igual que con la F-actina, está mediada por la plectina, siendo posible que la disociación de los HD esté influida por la inhibición de la interacción $\alpha 6\beta 4$ -plectina, puntualmente en los dominios FnIII 1 y 2 de β .

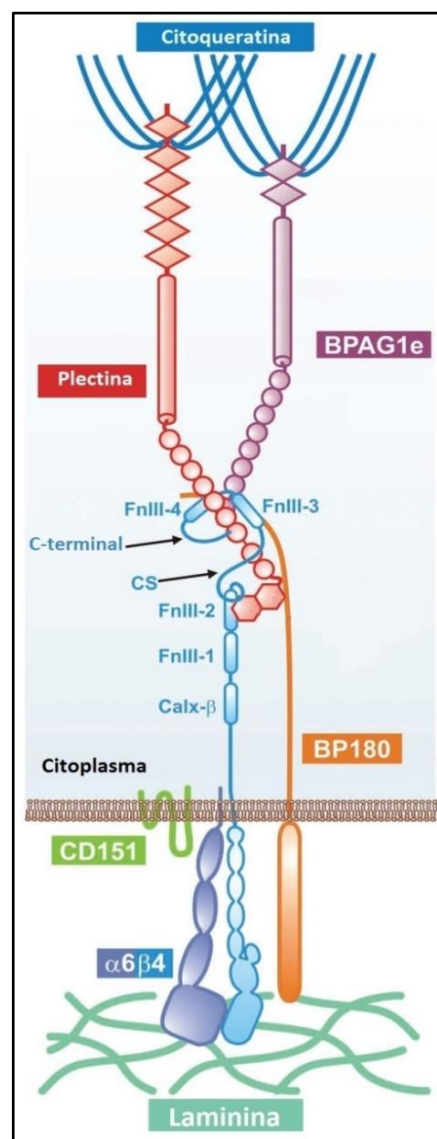


Figura 5. Organización estructural de un hemidesmosoma tipo I. $\alpha 6\beta 4$, BP180 y CD151 son proteínas transmembrana mientras la plectina y BPAG1e se localizan en el citoplasma. $\alpha 6\beta 4$ conecta la laminina extracelular con los filamentos intermedios de citoqueratina mediante la plectina y BPAG1e. $\beta 4$ consta de un dominio calx- β seguido de cuatro dominios tipo fibronectina tipo III: 1 y 2 están separados por segmento conector (CS) de 3 y 4. Adaptado de Pereda *et al.*, 2009.

El dominio 2 provee la interacción principal mientras que el 1 brinda contactos adicionales. La interacción $\beta 4$ -plectina podría estar regulada alostéricamente por la conformación de $\beta 4$. Análisis mutagénicos revelaron que estos sitios son puntos calientes (Pereda *et al.*, 2009). Por otro lado, la porción intracelular de $\alpha 6$ consta de una cola corta, encontrándose 2 isoformas sin diferencias funcionales (Diaz *et al.*, 2005).

La integrina $\alpha 6\beta 4$ parece tener importancia en la malignidad del cáncer mamario, así como en otros carcinomas epiteliales (Bon *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2005; Gabarra *et al.*, 2010). Existe una dicotomía en la cual $\alpha 6\beta 4$ cambia de una función mecánica adhesiva a una señalizadora en la invasión tumoral (Lipscomb *et al.*, 2005). Se piensa que el potencial oncogénico de esta integrina podría activarse y, por ende, su habilidad para regular la expresión de genes proinvasivos, cuando la misma se libera de los HD, ya que su expresión se mantiene mientras se disocian las estructuras epiteliales durante la oncogénesis. Ciertos estudios sugieren que la expresión de $\alpha 6\beta 4$ se incrementa en carcinomas metastásicos y que sus niveles se correlacionan con la progresión cancerosa (Chen *et al.*, 2009; Rabinovitz *et al.*, 2001).

1.6. Proteínas fosfatidilinositol 3-quinasas: PI3Ks.

Las proteínas fosfoinositol 3-quinasas (PI3Ks) conforman una familia de enzimas que fosforilan el grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo inositol de moléculas denominadas fosfoinositoles (Huang *et al.*, 2008). Actúan, por lo tanto, como moléculas señalizadoras que regulan una amplia variedad de funciones celulares como el crecimiento, la supervivencia, la movilidad y el metabolismo (Courtney *et al.*, 2010).

Las PI3Ks se pueden agrupar en base a su estructura y función en tres clases (I-III) (Figura 6A). Particularmente, las PI3Ks pertenecientes a la clase I catalizan la formación de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP_3) y se pueden clasificar en dos subgrupos, IA y IB. Las PI3K de la clase IA son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de 110kDa y una subunidad reguladora de 85kDa (Courtney *et al.*, 2010).

Existen tres genes denominados *PIK3R1*, *PIK3R2* y *PIK3R3* que codifican las distintas isoformas de la subunidad reguladora, las cuales se conocen colectivamente como p85 (Huang *et al.*, 2008). El gen *PIK3R1* codifica para tres de las isoformas (p85 α , p55 α and p50 α), *PIK3R2* para la isoforma p85 β y *PIK3R3* para p55 γ . La subunidad reguladora está constituida por cinco dominios denominados SH3 (Src homology 3), GAP (GTPase-activating protein), nSH2 (N-terminal SH2), iSH2 (inter-SH2) y cSH2 (C-terminal SH2) (Gabelli *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008) (Figura 6B).

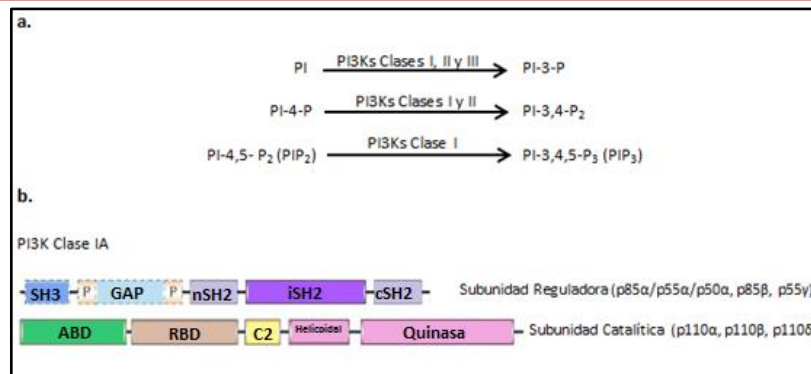


Figura 6. Diferencias entre las clases de PI3K. A). Función y B). Estructura de la Clase IA (Modificado de Engelman *et al.*, 2006).

Asimismo, tres genes *-PIK3CA, PIK3CB* y *PIK3CD-* codifican, respectivamente, las isoformas p110 α , p110 β and p110 δ de la subunidad catalítica (Engelman *et al.*, 2006; Courtney *et al.*, 2010). La subunidad catalítica también está conformada por cinco dominios llamados ABD (adaptor binding domain), RBD (Ras binding domain), C2, helicoidal y quinasa (Gabelli *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008) (Figura 7 A y B).

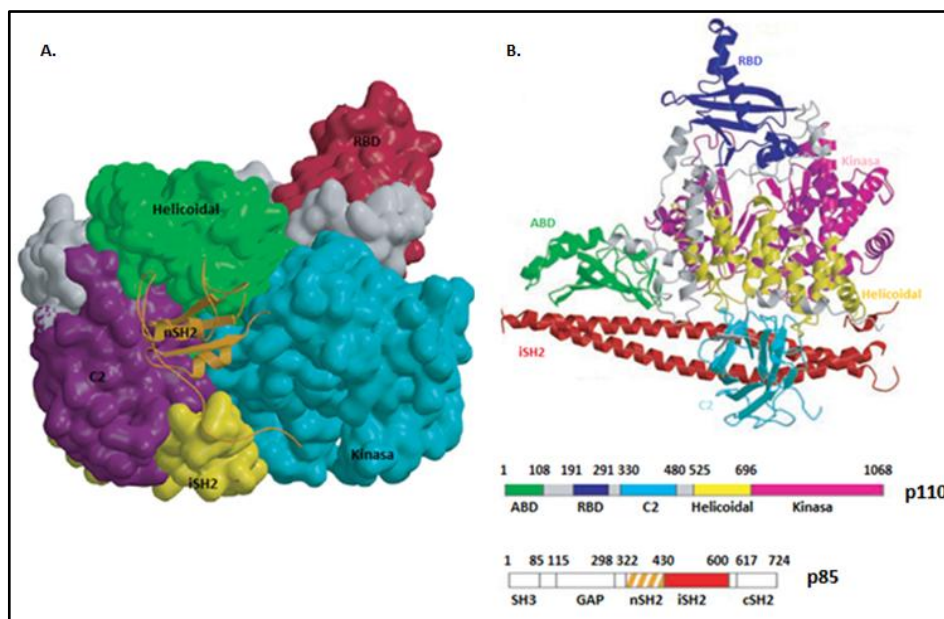


Figura 7. Estructura de p110 α . A). Se muestran los cinco dominios de la subunidad catalítica y dos dominios de la subunidad reguladora, donde nSH2 cumple la función de andamiaje para el resto de la estructura (Modificado de Mandelker *et al.*, 2009). B). Diagrama de lazos de la estructura y subunidades catalítica y reguladora, donde se indican los residuos que determinan cada dominio (Modificada de Huang *et al.*, 2007).

1.6.1. Vía de señalización de PI3K y activación en cáncer

La vía de señalización mediada por las PI3Ks se inicia cuando un factor de crecimiento estimula un receptor tirosina quinasa (RTK) provocando la autofosforilación de

1. INTRODUCCIÓN

su porción intracelular. Los residuos tirosina fosforilados del RTK interaccionan con el dominio SH2 de la subunidad reguladora de las PI3K, permitiendo que la subunidad catalítica se active y transfiera un grupo fosfato de una molécula de ATP a su sustrato, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), que se encuentra anclado en la membrana plasmática. De este evento resulta PIP₃, que actúa como segundo mensajero para activar AKT/PKB, que a su vez media la activación/inhibición de otras proteínas cuesta abajo en la vía, regulando diversas funciones celulares. Por otro lado, los efectos de PI3K se antagonizan al desfosforilarse PIP₃, mediante la acción de la fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) (Liang *et al.*, 2006; Arcaro y Guerreiro, 2007; Courtney *et al.*, 2010).

Dado que la vía de señalización PI3K/AKT está implicada en importantes funciones celulares como el crecimiento, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y el reordenamiento del citoesqueleto, la activación descontrolada o la regulación anormal de la misma juega un rol clave en el desarrollo de múltiples cánceres (Liang *et al.*, 2006; Arcaro y Guerreiro, 2007; Courtney *et al.*, 2010) (Figura 8).

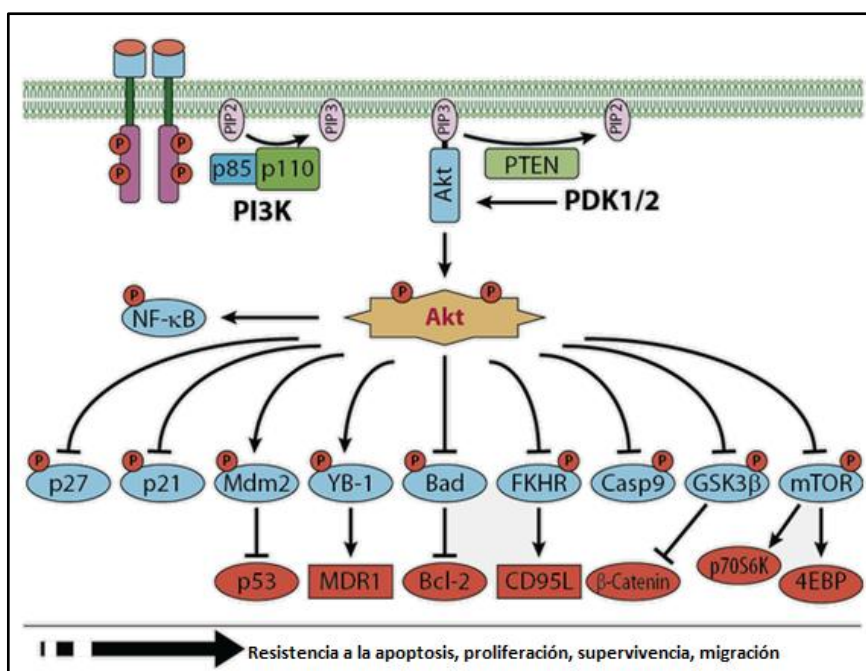


Figura 8. Relación de la vía de PI3K y el desarrollo del cáncer⁴.

El aumento de la señalización de la vía en cánceres humanos es frecuentemente ocasionado por pérdida de función de algún componente indispensable de la vía, como *PTEN*, o bien por amplificaciones o mutaciones activadoras en genes como *PIK3CA* (Courtney *et al.*, 2010).

Se han identificado un gran número de mutaciones somáticas en *PIK3CA* en una variedad de tumores humanos, incluyendo el cáncer de mama (Samuels y Velculescu, 2004;

⁴(<http://www.sfb773.de/html/projectC5.html>)

Samuels *et al.*, 2004; Arcaro y Guerreiro, 2007; Samuels y Waldman, 2010). La expresión de estos mutantes de *PIK3CA* llevan a un incremento en el potencial oncogénico, es decir, causan señalización constitutiva a lo largo de la vía en ausencia de factores de crecimiento y por ende parecen obviar las interacciones obligadas con las tirosinas fosforiladas de los RTKs y/o adaptadores (Courtney *et al.*, 2010).

Mutaciones activadoras en *PIK3CA* han sido frecuentemente identificadas en cánceres humanos, no así en los genes codificantes de las isoformas β , δ o γ . Sin embargo, se han observado sustituciones poco frecuentes en residuos en β y γ , pero de funciones aún desconocidas (Courtney *et al.*, 2010).

1.7. AKT /Proteína Kinasa B (PKB)

AKT (además conocida como proteína kinasa B-PKB) es una subfamilia de proteínas serina/treonina kinasas y en los mamíferos los genes que las codifican son equivalentes al oncogen viral murino v-akt, donde fue identificado por primera vez. Existen tres isoformas de AKT: Akt1 (AKT α), Akt2 (AKT β), Akt3 (AKT γ), codificadas por tres genes diferentes situados en distintos cromosomas. La isoforma Akt1 es la de expresión más generalizada; Akt2 se expresa predominantemente en tejidos de respuesta a insulina y Akt3 en cerebro (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000). Cada miembro contiene un dominio N-terminal de homología a plectina (PH), una corta α -hélice de unión y un dominio kinasa C-terminal (Testa y Bellacosa, 2001). Si bien estas isoformas comparten estructuras similares (aproximadamente un 80% de los aminoácidos), su expresión y actividad biológica difieren significativamente (Brodbeck *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 1999; Brodbeck *et al.*, 2001).

Tanto en células normales como cancerígenas, los estímulos que activan PI3K inducen el reclutamiento de AKT a la membrana plasmática por interacción directa con el dominio de homología a plectina (PH) de AKT (Fresno Vara *et al.*, 2004). Subsecuentemente, los aminoácidos reguladores de AKT: Thr 308 es fosforilado por la kinasa dependiente de PI3K-1 (PDK1) y la Ser 473 por autofosforilación u otras kinasas para alcanzar la activación máxima (Brazil *et al.*, 2004). Una vez fosforilada y activada, AKT puede trasladarse a varias localizaciones subcelulares donde puede fosforilar sus blancos en varias vías. AKT juega un rol crítico en la supervivencia celular interactuando negativamente con proteínas promotoras de la apoptosis (BAD, BAX, Caspasas-9) y con proteínas involucrados en la proliferación celular (p21 y p27), crecimiento celular (mTOR), movilidad celular e invasión (GSK-3 β) (Figura 9). Estas proteínas además juegan un rol crítico en carcinogénesis y metástasis (Kumar *et al.*, 2013).

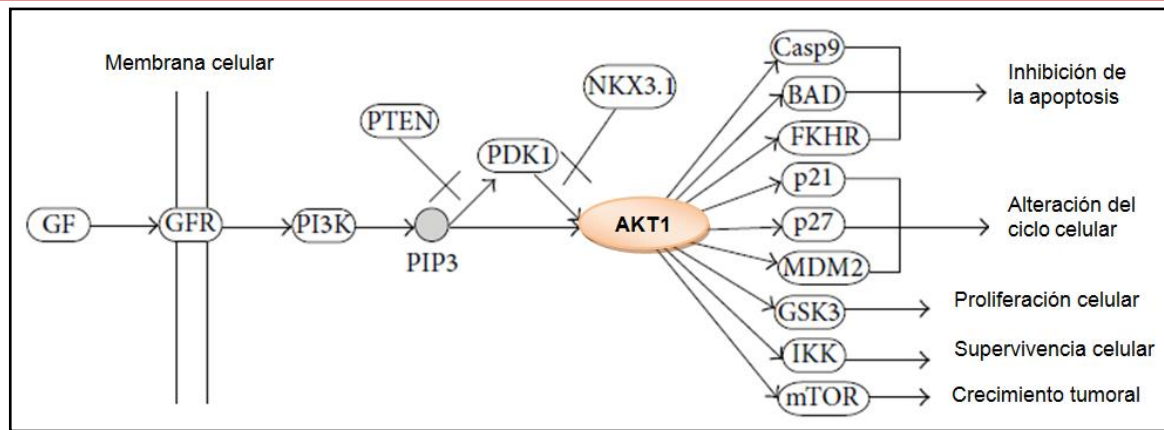


Figura 9. Regulación de la señal de AKT activada (Tomado y adaptado de Kumar *et al.*, 2013).

1.8. Familia de proteínas BCL-2: Bcl-2 y Bax

La familia BCL-2 es un grupo de proteínas evolutivamente conservadas, relacionada con la apoptosis que se subdivide en dos grandes clases: *proapoptóticos* dentro de los cuales se encuentran Bax y Bad, presentes en el citosol o el citoesqueleto; y *antiapoptóticos*, como Bcl-2 y Bcl-xL presentes en mitocondria, retículo endoplásmático y membrana nuclear, cuya función es proteger a las células de la apoptosis arrestándolas en G₀.

Esta familia de proteínas puede contar con hasta cuatro segmentos conservados alfa helicoidales llamados dominios BH (de homología Bcl-2). Los dominios BH1y BH2 contienen regiones conservadas de similitud de aminoácidos. El dominio BH3 es crucial para la actividad de muerte celular de los miembros proapoptóticos y el dominio BH4 es importante por su actividad antiapoptótica y es menos conservado en miembros proapoptóticos (Saxena *et al.*, 2013; Zha *et al.*, 1996) (Figura 10).

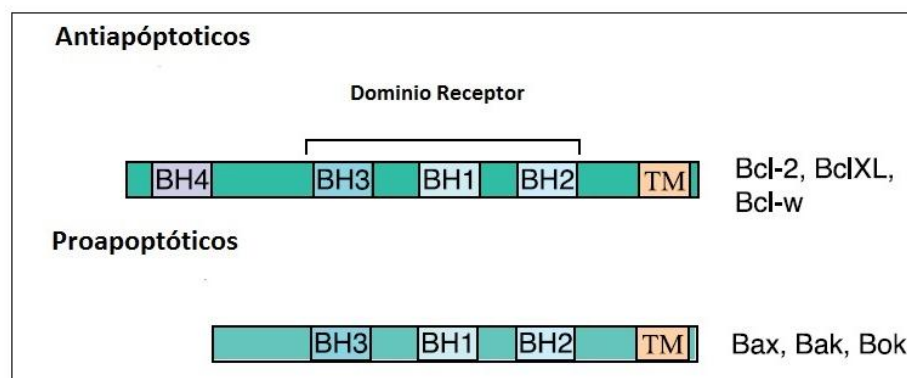


Figura 10. Dominios estructurales de la familia BCL-2 (Tomado de Chan y Yu, 2004).

Bax codifica para la proteína proapoptótica Bax alfa de 21 KDa (Moshynska *et al.*, 2005; Thomadaki y Scorilas, 2009). Ésta, mediante la formación de homodímeros, permite la

1. INTRODUCCIÓN

creación de canales en la mitocondria jugando un papel clave en la liberación del citocromo c y otros factores apoptóticos relacionados, llevando así a la activación de las caspasas (Gross *et al.*, 1999). Además, el producto proteico del gen Bax heterodimeriza con Bcl-2 a través de los dominios BH1 y BH2, anulando la actividad de Bcl-2 de suprimir la apoptosis (Chen *et al.*, 1996).

Las características estructurales de Bax le permiten además interactuar con otros miembros de la familia Bcl-2 que no requieren BH1 y BH2 para la heterodimerización con Bax, así como para la homodimerización con sí mismo (Zha *et al.*, 1996).

Bax se trasloca constantemente a las mitocondrias en células sanas, donde las proteínas que promueven la supervivencia (como Bcl-2) se unen a Bax y regresan al citoplasma, de este modo estabilizan la conformación inactiva de Bax (Edlich *et al.*, 2011). Así, mediante la formación de heterodímeros (Bax-Bcl2), Bcl2 promueve la formación de canales que estabilizan la membrana mitocondrial, impidiendo la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas, familia de proteasas efectoras que pueden degradar y activar citosinas proinflamatorias (Starczynski *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2009). Sin embargo, en ausencia de Bcl-2 libre, Bax mitocondrial se somete a un cambio conformacional que la lleva a la integración a la membrana y la formación de homodímeros, promoviendo la apoptosis (Edlich *et al.*, 2011) (Figura 11).

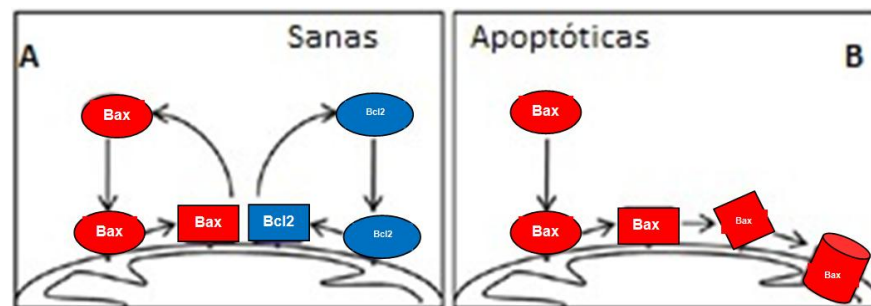


Figura 11. Mecanismo de activación/inhibición de Bax. A) Bax (rojo) y Bcl2 (azul) traslocación y retrotraslocación constante al citosol, estabilizando a Bax citosólica en células sanas. B). En ausencia de Bcl-2 libre, Bax mitocondrial puede cambiar conformacionalmente llevándola a integrarse a la membrana y promoviendo la apoptosis. (Modificado de Edlich *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que la delección de los dominios BH1 o BH2 de Bcl-2 así como algunas sustituciones en ciertos aminoácidos en estos dominios conservados suprimen la función de Bcl-2 como un supresor de muerte celular y también anula la habilidad de Bcl-2 de formar heterodímeros con Bax (Zha *et al.*, 1996).

En la formación de tumores y la progresión al cáncer, estos miembros de la familia Bcl-2 pueden actuar de manera tanto oncogénica como tumor-supresora. La predominancia

de uno u otro, parece ser tanto tejido específico como contexto dependiente (Starczynski *et al.*, 2005; Lehnerdt *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 1999).

Además, cabe destacar que p53 (gen supresor de tumores) es un regulador transcripcional de Bax y la inactivación de p53 ocurre en alrededor de la mitad de todos los tumores humanos, implicando que la pérdida de este gen representa un paso fundamental en la patogénesis del cáncer (Miyashita y Reed, 1994; Thomadaki y Scorilas, 2009).

PARTE III: Relación entre variantes genéticas y carcinogénesis

1.9. Variantes genéticas y enfermedad

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Una variante de secuencia se denomina “polimorfismo” si se presenta en la población con una frecuencia igual o superior al 1%, de lo contrario se denomina “mutación”. Se ha estimado que hay una variante cada 1.000 pares de bases de los 3.000 millones que configuran el genoma humano. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (Luque y Herráez Sánchez, 2000; Iniesta *et al.*, 2005).

Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de “alta penetrancia”, ya que los portadores de la variante suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. Estas variantes suelen ser de baja frecuencia en la población general. En la actualidad muchas investigaciones centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos que se encuentran en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad (son los llamados polimorfismos de “baja penetrancia”). También se denominan variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad, y para que dicha variante genética se exprese, frecuentemente es necesaria la participación de una exposición (Iniesta *et al.*, 2005).

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base, Polimorfismos de un Único Nucleótido (SNP; *single nucleotide polymorphism*). Otros polimorfismos son repeticiones, en un número variable de veces, de una secuencia corta (VNTR; *variable number of tandem repeat*), deleciones o inserciones de secuencias cortas de nucleótidos. Si el cambio de

un nucleótido ocurre en una región codificante, puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína resultante, y ello puede resultar en una modificación de su actividad o función. Así mismo, pueden ocurrir en regiones del promotor de un gen y modificar su expresión o en intrones, que aunque no se traducen a proteína, cambios en su estructura pueden modular la expresión de un gen. Sin embargo, la mayoría de las veces los cambios son silentes y no tienen repercusiones funcionales (Iniesta *et al.*, 2005).

Si bien sólo los estudios moleculares pueden poner de manifiesto si los polimorfismos son funcionales, los estudios epidemiológicos son fundamentales para valorar el efecto en la salud de la población (Iniesta *et al.*, 2005). Para los estudios de asociación son de particular interés los SNPs no sinónimos, debido a que frecuentemente conducen a cambios aminoacídicos que tienen un efecto deletéreo en la estructura y/o función de la proteína y que, en última instancia, contribuirían al desarrollo de la enfermedad (Jie *et al.*, 2006).

1.9.1. Polimorfismos en el gen HER2: W452C y I655V

Los polimorfismos de nucleótido simple no sinónimos (SNPsns) que residen en el gen *HER2* (Figura 12), pueden afectar la función de la proteína codificada, ya sea incrementando su dimerización, autofosforilación y/o su actividad tirosina quinasa, lo cual podría favorecer a la transformación celular (Frank *et al.*, 2005).

Así, el polimorfismo en la posición 452 de la secuencia aminoacídica de *HER2*, que provoca un cambio de triptófano a cisteína (W452C) en el dominio extracelular, sería el SNP no sinónimo de mayor efecto deletéreo en el receptor *HER2*, según un análisis *in silico* realizado por Rajasekaran y colaboradores (2008). Según este trabajo, la proteína *HER2* mutante portadora de este SNP, muestra una importante desviación estructural respecto a la proteína nativa; sin embargo, la presencia del SNP 452C otorgaría mayor afinidad de *HER2* con el anticuerpo Trastuzumab, sugiriendo que sería adecuado su utilización aún en presencia de este SNP deletéreo (Rajasekaran *et al.*, 2008).

Por otro lado, la presencia del polimorfismo en el codón 655 (Iso655Val) de *HER2* que codifica para el dominio transmembrana, ha sido reportado en diferentes tipos de cánceres (Papewalis *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2002; Satiroglu-Tufan *et al.*, 2006). Un estudio ha sugerido que la presencia de este polimorfismo está asociada con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, particularmente en mujeres jóvenes menores a 45 años (Xie *et al.*, 2000), aunque resultados de estudios posteriores han sido controversiales (Benusiglio *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2005). Estos resultados pueden deberse a las diferencias en el polimorfismo I655V de *HER2* entre grupos étnicos (Satiroglu-Tufan *et al.*, 2006).

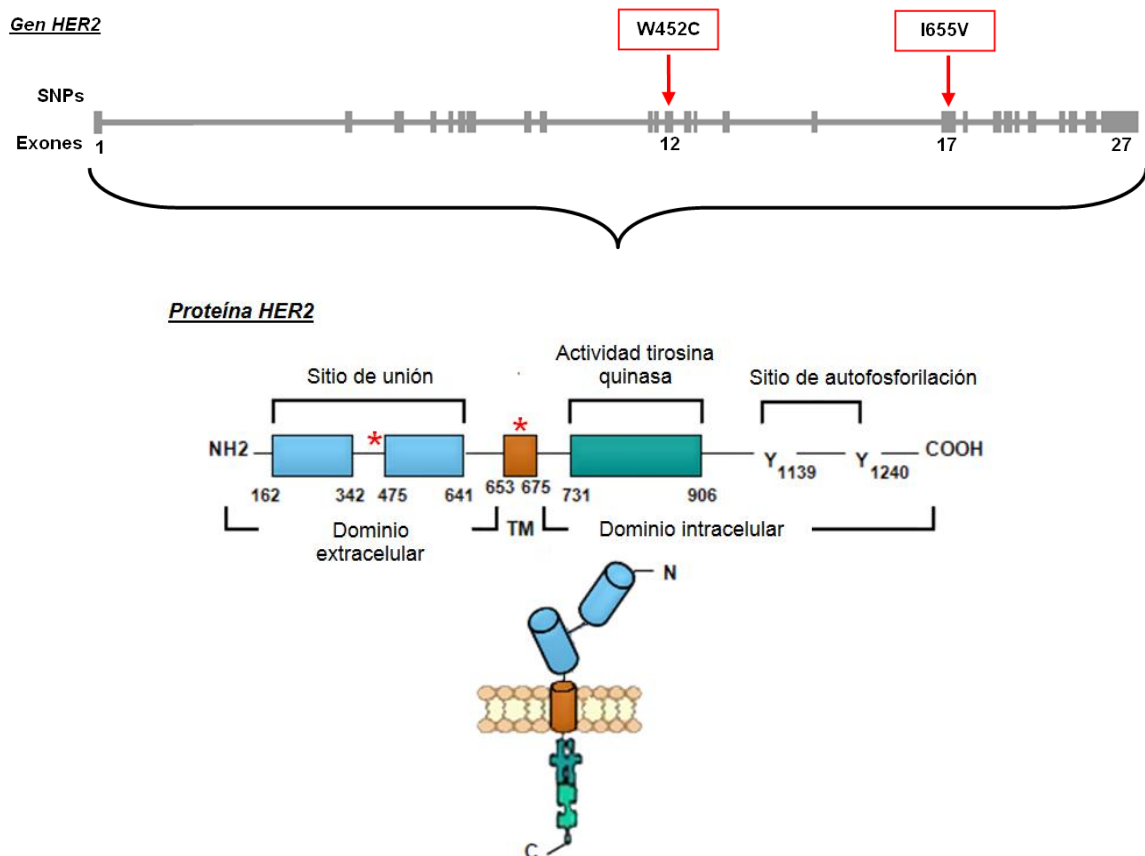


Figura 12. Esquema de la estructura génica y proteica de HER2. Arriba: se muestra el gen *HER2* y los SNPs en estudio W452C y I655V. Abajo: se muestran los dominios de la proteína de HER2 afectados por los SNPs (*) (Tomado y adaptado del *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*)⁵.

1.9.2. Mutaciones en los genes *ITGA6* e *ITGB4*

Mutaciones en los genes *ITGA6* e *ITGB4* pueden traducirse en proteínas truncas o de secuencia modificada que impiden el correcto funcionamiento de la célula. En epidermólisis bullosa, se ha descrito que la gravedad de las consecuencias puede relacionarse con el estado homo o heterocigoto del portador, el tipo y la localización de las mutaciones. Asimismo, se ha identificado una mutación patogénica en la posición nucleotídica 3841 dentro del exón 31 en el gen *ITGB4* que resulta en un cambio aminoacídico en la posición 1281 de la subunidad $\beta 4$, R1281W (rs121912467) (Pulkkinen *et al.*, 1998). Este residuo, ubicado en FNIII-2, es crítico para la interacción con la plectina. Como consecuencia, el sitio de unión sufre modificaciones, afectando la estructura de los HD y disminuyendo la adhesividad celular, requisitos del desarrollo cancerígeno (Mercurio *et al.*, 2001; Koster *et al.*, 2001; Pereda *et al.*, 2009) (Figura 13).

⁵ <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ERBB2ID162ch17q11.html>

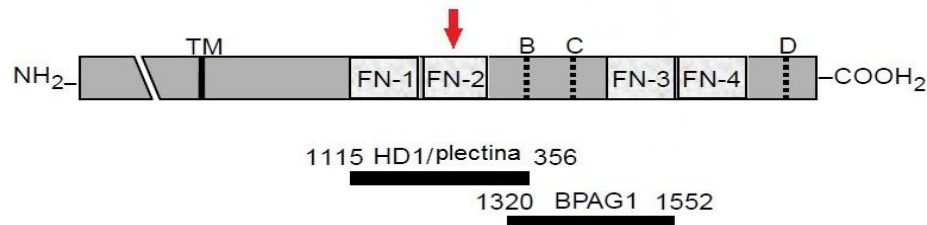


Figura 13. Esquema de la estructura de $\beta 4$. Se indican los dominios tipo fibronectina (FN), los sitios de *splicing* alternativo para las respectivas isoformas (B, C y D), las regiones de contacto con las demás proteínas del HD (barras negras) y el dominio transmembrana (TM). Con una flecha roja, se indica la posición de la mutación R1281W (Adaptado de Mercurio *et al.*, 2011).

Paralelamente, estudios en carcinoma tiroideo papilar demostraron una alta frecuencia del polimorfismo A380T (rs11895564) en la subunidad $\alpha 6$ y su asociación con el tamaño, número y metástasis linfática tumoral. Esto sugiere una relación con el desarrollo de la enfermedad convirtiéndolo en un posible marcador pronóstico (Kim *et al.*, 2011) (Figura 14).

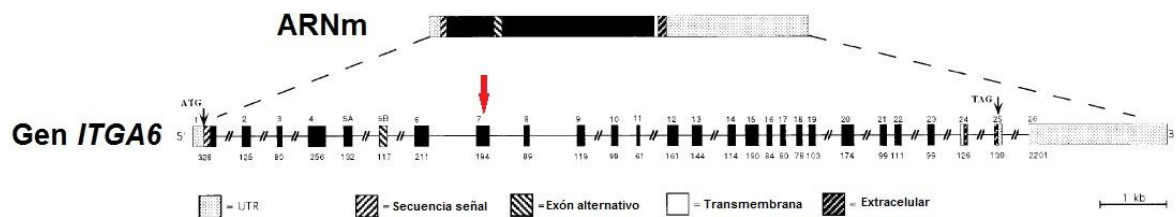


Figura 14. Gen *ITGA6* y ARNm. Se señala la ubicación del SNP A380T en el exón 7 con una flecha roja (Modificado de Pulkkinen *et al.*, 1998).

1.9.3. Mutaciones *hotspot* en el gen *PIK3CA*

El gen *PIK3CA*, el cual mapea en el locus 3q26.3, codifica para la subunidad catalítica de PI3K alfa de la clase IA (p110 α) (Figura 15).

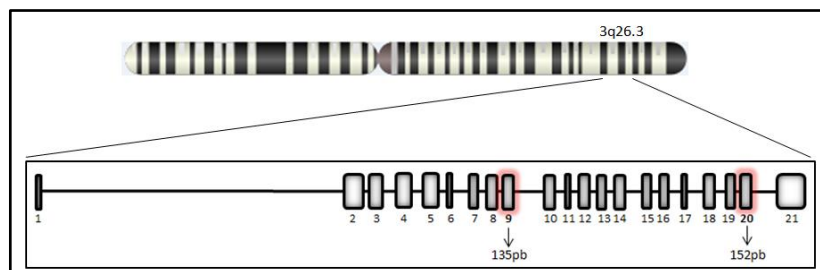


Figura 15. Estructura y ubicación cromosómica del gen *PIK3CA*. Las cajas representan exones. Se resaltan los exones de interés (9 y 20) y se indican sus longitudes en pares de bases.

Se han identificado mutaciones en este gen en varios tipos de cánceres (Samuels *et al.*, 2004), la mayoría de las cuales son de tipo “*missense*” (con cambio de sentido) y

1. INTRODUCCIÓN

frecuentemente se agrupan en tres regiones conservadas dentro de los exones 9 y 20 correspondiente a los dominios helicoidal y quinasa, respectivamente (Frendi *et al.*, 2009). Estos “sitios calientes para mutaciones”, donde las frecuencias de las mismas son mayores que en otras zonas del gen, se conocen como regiones *hotspot* (Martinez *et al.*, 2003).

Se ha observado que cambios en los residuos Glu542 y Glu545 en el exón 9 e His1047 en exón 20 corresponden a más del 75% de las mutaciones en *PIK3CA* (Samuels *et al.*, 2004) y dichas mutaciones “*hotspot*” resultan en formas oncogénicas de p110 α con actividad quinasa elevada que promueve la proliferación e invasión de las células cancerígenas (Leong *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010) (Figura 16).

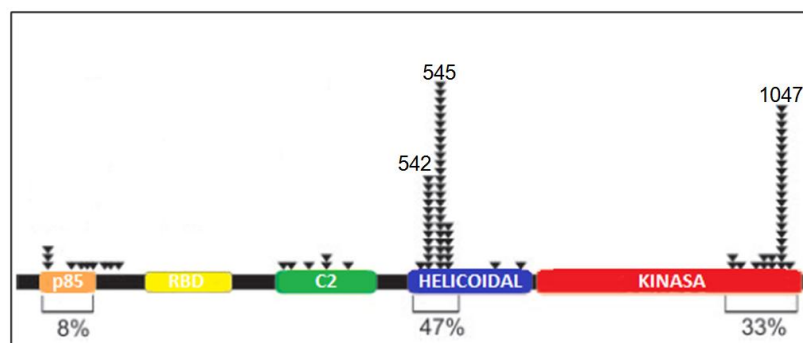


Figura 16. Mutaciones en *PIK3CA*. Se indican los dominios de p110 α y las mutaciones *hotspot* en las posiciones 542 y 545 en el exón 9 y 1047 en el exón 20 (Modificado de Samuels *et al.*, 2004).

Según el catálogo de mutaciones somáticas en la base de datos de cáncer (COSMIC⁶), *PIK3CA* presenta mutaciones en el 12% de todas las secuencias de tumores cargadas en el sistema, entre los cuales se observaron en un 25-40% de los casos de cáncer de mama, 14-32% en cáncer de colon y 4-25% en cáncer gástrico (Samuels y Waldman, 2010). Esta alta prevalencia de mutaciones en cánceres tan diversos hace que *PIK3CA* sea uno de los oncogenes humanos más frecuentemente mutado (Gabelli *et al.*, 2010).

La mutación de G→A en las posiciones 542 (rs121913273) y 545 (rs104886003) en el exón 9, provocan el cambio aminoacídico de glutamato (E) por lisina (K). Éstas se presentan en la interfase entre los dominios helicoidal (p110) y nSH2 (p85). Se presume que una alteración parcial de la interacción entre estos dominios podría reducir el efecto inhibitorio que ejerce nSH2 sobre el dominio quinasa (p110) con el cual también interactúa. Esto podría explicar el aumento de la actividad enzimática en presencia de estas mutaciones (Huang *et al.*, 2008). Por otra parte, la mutación de A→G en el exón 20 que lleva a la sustitución de histidina (H) por arginina (R) en la posición 1047 (rs121913279) dentro del dominio quinasa,

⁶(<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>)

alteraría el bucle de activación y por lo tanto, su interacción con los sustratos fosfatidilinositoles (Huang *et al.*, 2008).

1.9.4. Mutación E17K en AKT1

La proteína de AKT1 (56 kDa) consiste de 480 aminoácidos y está constituida por un dominio PH, una región helicoidal corta, un dominio kinasa catalítico y un motivo hidrofóbico regulador. El gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 14q32.33 y está compuesto por 14 exones, abarcando aproximadamente 26,4 kb (Figura 17).

Si bien las mutaciones en AKT son raras, se han descriptos diferentes tipos de alteraciones y varias patologías humanas, especialmente en cáncer humanos (Testa y Bellascosa, 2001; Altomare y Testa, 2005; Bellascosa *et al.*, 2005; Plas y Thomson, 2005). Sin embargo, se ha identificado una mutación somática recurrente (G>A) en el exón 3 del gen de AKT, que involucra la sustitución de ácido glutámico (E) por lisina (K) en el aminoácido 17 (E17K) en el dominio de homología a plectina de la proteína. Esta mutación puntual fue identificada en el 8% de los cánceres de mama, 6% colorectal y 2% de ovario. Se ha observado que la presencia de la mutación es mutuamente excluyente con respecto a las mutaciones de *PIK3CA* y pérdida de expresión de *PTEN*. Funcionalmente, se ha observado que la presencia de esta mutación estimula la señalización de AKT, induciendo transformación celular y produciendo leucemia en ratones, sugiriendo que podría jugar un rol crucial en el desarrollo del cáncer (Carpten *et al.*, 2007).

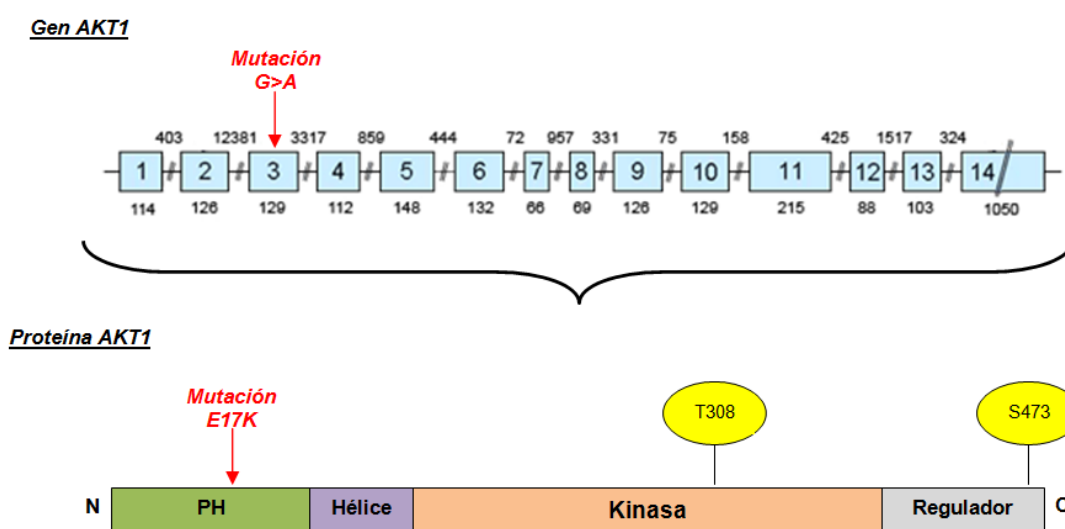


Figura 17. Esquema de la estructura genética y proteica de AKT1. Arriba: se muestra el gen AKT1 y la mutación en estudio (G>A). Abajo: se muestran los dominios de la proteína de AKT1 y la posición de la mutación E17K (Tomado y adaptado del *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*)⁷.

⁷ <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/AKT1ID355ch14q32.html>

1.9.5. Polimorfismos en los promotores de los genes Bax y Bcl-2:

El gen Bcl-2 fue originariamente descubierto debido a su participación en la translocación cromosómica que ocurre en la mayoría de los linfomas no Hodgkin de células B, de allí su nombre (Fontanini *et al.*, 1995). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 18q21.3, posee 3 exones (el primero no se transcribe) y tiene un tamaño aproximado de 400kb. El promotor está formado por dos regiones que se denominan P1 y P2. Cada una de las cuales tiene un sitio alternativo de inicio de la transcripción. La porción P1 está localizada entre los pares de bases (pb) 1386 a 1423 corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción y a esta región se le atribuyen los niveles constitutivos de la expresión de Bcl-2. El segmento del promotor denominado P2, está localizado aproximadamente a 1,3kb corriente abajo de P1. Se ha demostrado que la región P2 también contiene motivos de octámeros, proponiendo a esta región como un sitio potencial de aumento en la expresión de Bcl-2. En las regiones P1 y P2 existen diferentes elementos de regulación negativa y positiva (Luna-López *et al.*, 2008).

El gen Bax se localiza en el cromosoma 19q13.3, posee 6.939pb y consiste en 6 exones y 5 intrones (Thomadaki y Scorilas, 2009). Mutaciones en el promotor y en la región codificante son conocidos por alterar la expresión proteica y su función, afectando la habilidad de la apoptosis (Yildiz *et al.*, 2013).

Estudios de asociación entre SNPs tanto en Bcl-2 como Bax y el cáncer han aportado nuevos conocimientos acerca de los mecanismos del desarrollo cancerígeno (Sahu y Choudhuri, 2013). La diversidad de funciones fisiológicas en las que participan tanto Bcl-2 como Bax, sugieren un alto nivel de regulación, es por ello que el análisis de sus promotores resulta importante para comprender la función de sus proteínas.

En Bcl-2 se ha informado un sólo SNP en la región promotora (Figura 18), un cambio de C por A que se localiza en la posición -938. Se ha asociado la presencia de este SNP con una disminución en el riesgo de cáncer de próstata (Kidd *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

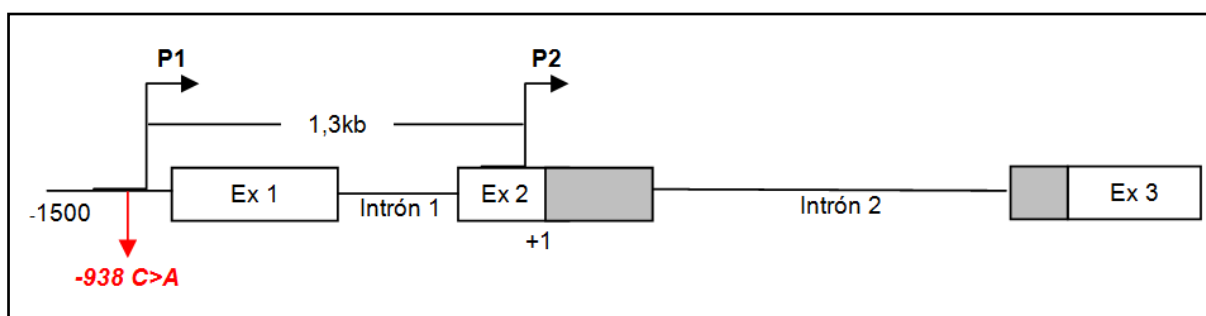


Figura 18. Esquema del gen Bcl-2. Se indican las regiones del promotor P1 y P2; y el SNP -398 C>A en estudio. Las áreas grises representan las regiones codificantes y las blancas las no codificantes. (Modificado de Kidd *et al.*, 2006).

Por otra parte, varios estudios han informado que el polimorfismo G(-248)A en el promotor de Bax (Figura 19), podría ser utilizado como un biomarcador de susceptibilidad o protección al cáncer, mientras que otros no han encontrado asociación alguna (Sahu y Choudhuri, 2013; Saxena *et al.*, 2002; Skogsberg *et al.*, 2006).

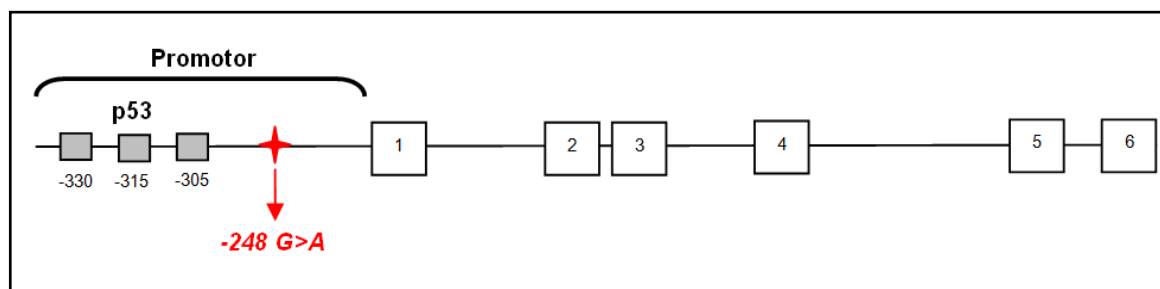


Figura 19. Esquema del gen Bax. La flecha roja indica la posición del SNP -248G>A en estudio. Las cajas grises representan los sitios de unión a p53 y las blancas los exones.

En pacientes con leucemia linfocítica crónica se ha encontrado que este SNP se asocia con la reducción en la expresión proteica, estadio avanzado de la enfermedad y una respuesta incompleta al tratamiento (Kholoussi *et al.*, 2014).

1.10. Análisis descriptivo de polimorfismos

La variación en el genoma humano es una fuente emergente para el estudio de las bases de enfermedades complejas, como el cáncer (Priya Doss *et al.*, 2008). Para identificar con mayor precisión los genes de interés y, dentro de esos genes, el o los polimorfismos responsables, se emplean estudios de asociación, en los que se compara la frecuencia relativa de las diferentes variantes de una serie de polimorfismos entre los individuos afectados y un grupo control adecuado. Estos estudios suelen seleccionar “genes candidatos” (aquellos cuya función puede estar relacionada con la enfermedad de interés), y dentro de esos genes se busca como marcadores genéticos a determinados polimorfismos, normalmente de tipo SNP, repartidos a lo largo del gen (Inieta *et al.*, 2005). Mediante análisis de asociación es posible detectar si una variante génica está relacionada al desarrollo de una patología (Alencar y Lopes, 2010; Shen *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, la existencia de bases de datos mundiales, como el Proyecto *HapMap*, hace posible un desarrollo mancomunado de conocimientos para comprender cómo la variación genética resulta en variación fenotípica (Alencar y Lopes, 2010).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

En el desarrollo y la progresión al cáncer, es frecuente que las vías de señalización implicadas en la proliferación, adhesión celular y mecanismos de supervivencia se encuentren alterados genéticamente, dotando de una ventaja selectiva a las células cancerígenas y resultando en un mal funcionamiento de estas vías. Teniendo en cuenta que estas alteraciones se deben principalmente a la presencia de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) y mutaciones puntuales en genes que regulan estos procesos; estas variantes genéticas son responsables de un aumento pequeño o moderado del riesgo de desarrollar cáncer y, por lo tanto, podrían explicar una fracción importante de la susceptibilidad cuando son consideradas en conjunto. En este contexto, la hipótesis de este trabajo fue que dada la importancia de los SNPs en enfermedades complejas como el cáncer, existe un riesgo asociado a la presencia de éstos y la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama en mujeres diagnosticadas de la ciudad de Posadas.

A fin de demostrar esta hipótesis, los **objetivos** del presente trabajo fueron:

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la contribución de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes implicados en la proliferación celular, la adhesión y mecanismos de supervivencia, en la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama.

Objetivos Específicos:

- Determinar la presencia de SNPs y mutaciones puntuales en los genes *HER2*, *ITGa6*, *ITGb4*, *PIK3CA*, *AKT1*, *BAX* y *BCL-2*, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa - Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) y PCR-secuenciación en muestras de carcinoma mamario (casos) y muestras sin cáncer (controles).
- Analizar comparativamente los niveles de variabilidad genética observados en casos y controles mediante las frecuencias genotípicas y alélicas; y la prueba de Chi-cuadrado (X^2); y evaluar la asociación entre las variantes genéticas estudiadas y la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama mediante el *Odds Ratio* (ORs).
- Estimar el efecto combinado de las variantes de secuencia en el fenotipo del cáncer de mama mediante software estadístico de Reducción de Dimensionalidad Multifactorial ó MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANÁLISIS GENÉTICO

3.1.1. Selección de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) y mutaciones puntuales.

En base al análisis bibliográfico, para el desarrollo del presente trabajo se seleccionaron mutaciones puntuales y SNPs que han sido asociados con la susceptibilidad al desarrollo de varios tipos de cánceres, incluido el cáncer de mama, mediante estudios caso-control y aquellos SNPs identificados como potencial y funcionalmente relevantes mediante análisis *in silico* (Tabla 1).

Tabla 1: SNPs y mutaciones seleccionados para el presente trabajo.

Gen	SNP	Acceso dbSNP
1. HER2	W452C (E16)	rs4252633
	I655V (E21)	rs1136201
2. ITG α 6	A380T (E7)	rs11895564
3. ITG β 4	R1281W (E31)	rs121912467
4. PIK3CA	E542K (E9)	rs121913273
	E545K (E9)	rs104886003
	H1047R / H1047L (E20)	rs121913279
5. AKT1	E17K - E17Sfs (E3)	rs121434592 - rs34409589
6. BAX	-248 G>A (Pr)	rs4645878
7. BCL2	-938 C>A (Pr)	rs2279115

3.1.2. Características del estudio, selección de las muestras y extracción de ADN

3.1.2.1. Características del estudio:

El presente trabajo se basa en un estudio retrospectivo de tipo caso-control. Corresponde a un diseño de tipo observacional analítico de base individual. Es decir, para probar la hipótesis y determinar si existe asociación entre un evento (enfermedad=cáncer de mama) y la exposición a un determinado factor (presencia de SNP) se seleccionan individuos que padecen la enfermedad (casos) e individuos libres del evento (controles). Posteriormente, se comparan ambos grupos en relación a la exposición al factor en estudio

3. MATERIALES Y MÉTODOS

(presencia de SNP), la cual se mide en forma retrospectiva (a partir del evento se busca la causa). Si la prevalencia de exposición entre casos y controles es diferente, entonces puede inferirse que la exposición al factor en estudio (SNP) puede estar asociada a una aparición aumentada o disminuida del evento (Lazcano Ponce *et al.*, 2001).

3.1.2.2. Selección de muestras:

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron dos tipos de muestras de carcinoma mamario que conformaron el grupo de “**casos**”: 66 muestras de tejido tumoral proveniente de biopsias, obtenidas mediante mastectomía y 21 muestras de sangre entera, obtenidas por punción.

Para la comparación de los niveles de variabilidad observados en muestras tumorales en relación a la población general, se utilizaron como grupo “**control**”: 125 muestras de ADN extraídas a partir de sangre entera correspondientes a mujeres sanas que no presentan antecedentes familiares de cáncer de mama, cuyo grupo etario se correspondía con la población de casos y en las que se ha descartado la presencia de tumores.

Para el grupo de casos, además se recopiló información clínico-patológica de relevancia (Tabla 2).

Tabla 2. Características demográficas y clínico-patológicas de los individuos con cáncer de mama

Parámetros	Nº total de casos (n=87)
Edad (año, promedio±SD)	29-82 (55,7 ± 12,25)
Diagnóstico patológico	
Carcinoma ductal	36
Carcinoma lobular	1
N/D*	50
Invasión linfovascular	
Positivo	43
Negativo	30
N/D	14
Receptor de Estrógeno (RE)	
Positivo	32
Negativo	17
N/D	38
Receptor de Progesterona (RP)	
Positivo	37
Negativo	12
N/D	38
HER2/neu	
Positivo	21

Negativo	28
N/D	38
Grado histológico	
Grado I	8
Grado II	45
Grado III	26
N/D	8
Periodo menopáusico	
Premenopausia	29
Postmenopausia	45
N/D	13

*N/D: no disponible

Las muestras de sangre de personas sanas fueron cedidas por el servicio de Laboratorio del Sanatorio Nosiglia y las de carcinoma mamario, por la Dra. María Angélica Lorenzatti del Sanatorio Boratti de la ciudad de Posadas, Misiones. Debido a que esta tesis se realizó en el marco del proyecto de investigación incentivado código 16Q496, FCEQyN-UNaM, las muestras fueron clasificadas con un código para preservar la identidad del paciente y la información obtenida fue confidencial siguiendo las reglamentaciones éticas, legales y jurídicas establecidas en las normas bioéticas nacionales (Disposición ANMAT 5330/97) bajo el consentimiento informado de cada paciente (Ver Anexo).

3.1.2.3. Extracción de ADN:

La extracción de ADN a partir de sangre entera se realizó mediante el método de *salting out* (Miller *et al.*, 1988), incorporando una purificación con cloroformo: isoamílico (24:1) para la obtención de ADN a partir de biopsias de carcinoma mamario. La integridad del ADN extraído se verificó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml, Promega) y visualizados con un transiluminador UV.

3.1.3. Obtención de cebadores y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.1.3.1. Obtención de cebadores:

Los cebadores para el estudio de los polimorfismos y mutaciones en los genes seleccionados, fueron diseñados utilizando las secuencias genómicas, disponibles en la base de datos del *GenBank*⁸ bajo los siguientes códigos de acceso: NC_000017.11/ID: 2064 (*HER-2*); NC_000003.11/ID: 5290 (*PIK3CA*); NC_000002.11/ID: 3655 (*ITGa6*); NC_000017.10/ID: 3691

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

3. MATERIALES Y MÉTODOS

(*ITGβ4*), NC_000014.8/ID: 207 (*AKT1*), NC_000019.10 ID: 581(*BAX*) y NC_000018.10/ID: 596 (*BCL2*).

Para el diseño de cebadores destinados a amplificar las regiones genómicas que contienen a los SNPs: W452C (*HER2*) y A380T (*ITGα6*) y la mutación R1281W (*ITGβ4*), se utilizó el programa *Primer3* versión 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000) y la herramienta *Blast Primer*⁹ disponibles en línea. En el diseño se tuvieron en cuenta las siguientes características: la cantidad de bases (18-24 pb), el par de cebadores debe tener temperaturas de hibridación cercanas (es decir, diferencias dentro de los 5°C), el contenido de G:C debe mantener un rango de entre 40-60%, el inicio y la terminación tiene que contener una o dos bases púricas y no repetitivas en el extremos 3' (Cariaga Martínez y Zapata PD, 2007).

Para el estudio de los polimorfismos I655V (*HER2*), -248G-A (*BAX*) y -938C-A (*BCL2*) y las mutaciones E542K, E545K, H1047R (*PIK3CA*) y E17Sfs, E17K (*AKT1*) se utilizaron cebadores descritos previamente en la bibliografía (Xie *et al.*, 2000; Samuels *et al.*, 2004; Starczynski *et al.*, 2005; Carpten *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Los cebadores utilizados fueron sintetizados por OPERON (*Technologies*, Alemania) (Tabla 3).

Tabla 3: Cebadores utilizados para amplificación de las regiones de interés de los genes en estudio.

Gen-SNP/Mutación	Cebadores (5'-3')	Productos (pb)
HER2 - W452C	F: GGGATGGAGGAAGATGAGAA R: GTGTGCACGAAGCAGAGGT	199
HER2 - I655V	F: AGAGCGCCAGCCCTCTGACGTCCAT R: TCCGTTTCCTGCAGCAGTCTCCGCA	148
ITGα6 - A380T	F: ACATGAACCAGCAAGGCAGA R: ACCTGGGTAGCCATCTTGATT	122
ITGβ4 - R1281W	F: CCCATGAAGAAAGTGCTGGT R: CGATAGGGATGTCAGGGATG	298
PIK3CA - E542K-E545K	F: ACTTCAGCAGTTACTATTCTGTGAC R: GATTTCCACAAATATCAATTTACAA	575
PIK3CA - H1047R	F: TGCATACATTCGAAAGACC R: CCTATGCAATCGGTCTTTGC	237
AKT1 - E17Sfs-E17K	F: ACATCTGTCCITGGCACAC R: GCCAGTGCTTGTTGCTTG	353
BAX - -248 G>A	F:TTAGAGACAAGCCTGGGCGT R:CAATGAGCATCTCCCGATAA	280

⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

BCL2 --938 C>A	F:CTGCCTTCATTTATCCAGCA R:GGCGGCAGATGAATTACAA	262
----------------	---	-----

3.1.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Para las amplificaciones por PCR, se partió de una reacción estándar con un volumen final de 20µl y 60µl (para los fragmentos génicos que fueron secuenciados) conteniendo buffer PCR (con KCl y pH 8,8), 100µM de dNTPs, 0,5U de Taq polimerasa (*Thermo Scientific*), 1µl (aprox. 10ng) de ADN y concentraciones de MgCl₂ y de cebadores específicos para cada región de interés (Tabla 4). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos;
- 35 ciclos de amplificación que incluyeron una etapa de desnaturalización a 94°C, una de hibridación específica para cada cebador y otra de extensión a 72°C. Cada una tuvo una duración de 40 segundos.
- Extensión final a 72°C por 5 minutos;
- Periodo adicional final a 10°C durante 5 minutos para mantenimiento adecuado del termociclador.

Tabla 4: Condiciones de PCR específicas para cada region de interés.

Gen-SNP/Mutación	Vf (µl)*	[MgCl ₂]	[Cebadores]	(Th)°C**
HER2 - W452C	20	1,5mM	3pmol	54
HER2 - I655V				62
ITGα6 - A380T	20	1,5mM	5pmol	58
ITGβ4 - R1281W	60			61
PIK3CA - E542K-E545K	20	3,5mM	5pmol	62
PIK3CA - H1047R	60	1.5mM		55
AKT1 - E17Sfs-E17K	60	1.5mM	5pmol	60
BAX - -248 G>A	20	1.5mM	5pmol	60
BCL2 --938 C>A	20			62

*Vf= Volumen final

**Th= temperaturas de hibridación

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador BIOER GenePro (TC-E-96G y TC-E-48D).

Para verificar los resultados de la amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed™ (*Nucleic Acid Gel Stain 10,000X in water*), a 120V por 30 minutos con buffer TBE 0,5X. Se corroboró el tamaño de los amplicones, por comparación con un marcador de peso molecular de 100pb (100pb DNA ladder, GenBiotech). Los geles fueron visualizados mediante un transiluminador UV (MUV21-312-220) y fotografiados con una cámara digital Canon PowerShot G10.

3.1.4. Análisis de variantes genéticas mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

3.1.4.1. Selección de enzimas de restricción:

Para el análisis de los polimorfismos y mutaciones en los genes *HER2*, *PIK3CA* (exón 9), *ITGa6*, *ITGβ4*, *BAX* y *BCL2*, se optó por utilizar la técnica RFLP debido a que las variantes genéticas en estudio se encuentran dentro de los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Las mismas fueron seleccionadas utilizando el programa *NEBcutter*¹⁰ versión 2.0 disponible en línea (Tabla 5).

Tabla 5: Enzimas de restricción seleccionadas para la identificación de 8 SNPs mediante el programa *NEBcutter*.

SNP	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento 5'-3'
W452C	Cac8I	GCN↓NGC
I655V	Alw26I	GTCTCN↓
A380T	Taai (Tsp4CI)	ACN↓GT
R1281W	BseNI (BsrI)	ACTGGN↓
E542K	Hpy188I	TCN↓GA
E545K	TscAI (TspRI)	NNCASTGNN↓
-248 G>A	TauI	GCSG↓C**
-938 C>A	BccI	CCATC(N) ₄ ↓

*En rojo se indican las posiciones de los SNPs/mutaciones dentro del sitio de reconocimiento de cada enzima. La flecha indica el punto de corte.

**S = G ó C

¹⁰ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

3.1.4.2. Análisis de restricción:

Para el análisis de restricción, los productos de PCR fueron sometidos a digestión según las instrucciones de cada enzima. Las condiciones utilizadas para cada SNP se muestran a continuación (Tabla 6).

Tabla 6: Condiciones de restricción utilizadas cada variante.

	W452C	I655V	A380T	R1281W	E542K	E545K	-248 G>A	-938 C>A
Agua	12,9µl	12,9µl	12,9µl	12,9µl	9,9µl	12,9µl	12,9µl	12,9µl
Buffer	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
PCR	5µl	5µl	5µl	5µl	8µl	5µl	5µl	5µl
Enzima	0,5U	4U	1U	1U	1U	1U	1U	1U
Tº incubación	37°C	37°C	65°C	65°C	37°C	65°C	55°C	37°C
Tiempo de Incubación	12-16hs	12-16hs	12-16hs	55°C	12-16hs	12-16hs	20hs.	20hs.
Inactivación	65°C por 20 min	65°C por 20 min	20mM EDTA	80°C por 20 min	65°C por 20 min	20mM EDTA	20mM EDTA	65° por 20 min

Los SNPs se evidenciaron por la digestión de los amplicones o la ausencia de la misma según se altere o no el sitio de reconocimiento de la enzima. Los fragmentos obtenidos por digestión y la interpretación de los resultados de RFLP se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Interpretación de los resultados de RFLP a partir de las digestiones enzimáticas.

Enzima	Digestión	Fragmentos obtenidos (pb)	Alelo*	Presencia SNP/Mutación
Cac8I	Si	117 y 82	TGG (Trp)	No
	No	199	TGT (Cys)	W452C
Alw26I	Si	122 y 26	ATC (Ile)	No
	Si	90, 32 y 26	GTC (Val)	I655V
TaaI	No	122	GCA (A)	No

3. MATERIALES Y MÉTODOS

(Tsp4CI)	Si	80pb y 42	A CA (T)	A380T
BseNI	Si	170 y 118	CGG (R)	No
(BsrI)	Si	130, 118 y 40	T GG (W)	R1281W
Hpy188I	Si	472 y 103	GAA (E)	No
	Si	244, 228 y 103	A AA (K)	E542K
TscAI	Si	359 y 216	GAG (E)	No
(TspRI)	No	575	A AG (K)	E545K
TauI	Si	234 y 46	G	No
	No	280	A	-248 G>A
BccI	No	262	C	No
	Si	154 y 108	A	-938 C>A

*En rojo se indican los SNPs.

Para el análisis del SNP W452C de *HER2*, las digestiones fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 8% a 150V por 60 minutos en buffer TBE 0,5X, luego fueron teñidos con nitrato de plata (0,2%) y escaneados.

Para los SNPs restantes el análisis se realizó en geles de agarosa al 3% a 150V por 30-45 minutos en buffer TBE 0,5X; luego fueron teñidos con GelRed™ (*Nucleic Acid Gel Stain 10,000X in water*). Los geles fueron visualizados mediante un transiluminador UV (MUV21-312-220) y fotografiados con una cámara digital Canon PowerShot G10.

En ambos casos, se utilizó un marcador de peso molecular de 50pb (GeneRuler 50pb, *Fermentas*). Posteriormente, los distintos patrones de bandas obtenidos fueron corroborados por secuenciación (MACROGEN INC., Corea).

3.1.5. Análisis de mutaciones mediante PCR-secuenciación.

Para el análisis de las mutaciones H1047R en el exón 20 del gen *PIK3CA* y E17Sfs/E17K en el exón 3 del gen *AKT1*, 50µl de los productos de PCR correspondientes a la población de casos y controles, fueron enviados a la empresa MACROGEN INC. (Corea) para su secuenciación. En ambos casos, se secuenciaron con el cebador *reverse* y los electroferogramas fueron analizados con el programa *Chromas Lite versión 2.1.1*.

La utilización de esta técnica nos permitió además analizar otros 16 polimorfismos/mutaciones vecinos a las variantes de interés, incluyendo un polimorfismo presente en la misma posición del SNP H1047R de *PIK3CA* (H1047L). Todos ellos se

encuentran descriptos en la base de datos de Polimorfismos de Nucleótido Simple (dbSNPs) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) (Tabla 8).

Tabla 8: Posición de variantes vecinos a los SNPs en estudio.

SNP target	SNPs vecinos
PIK3CA (E20) SNP 0 = H1047R	0 A>T / -5 G>A / -30 G>A / -58 A>G / UTR3 -77 T>C / UTR3 -80 G>A / UTR3 -85 T>C / UTR3 -96 T>C +1 C>T / +11 G>T / +67 A>G / +78 A>G
AKT1 (E3) SNP 0 = E17K - E17Sfs	+43 A>G / +47 T>G / +78 C>T / +89 C>A

3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.2.1. Frecuencias genotípicas y génicas:

En una primera instancia se evaluó la distribución de los genotipos y alelos en los grupos de casos y controles. Las frecuencias genotípicas y génicas observadas y esperadas para cada SNP/mutación, se obtuvieron mediante los cálculos:

$$\text{Fr Genotípicas Observadas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de genotipos observados}}{\text{N}^\circ \text{ total observado}}$$

$$\text{Frecuencias Genotípicas Esperadas} = p^2, 2pq, q^2$$

$$\text{Frecuencias Génicas: } p = \frac{AA+1}{2Aa}$$

$$q = \frac{aa+1}{2Aa}$$

(donde "A" es el alelo normal y "a" el alelo mutante).

Posteriormente, se evaluó el Equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de chi-cuadrado (χ^2), con la fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^K \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad \text{con } k=1 \text{ grado de libertad}$$

(donde k es el número de genotipos posibles, O_i corresponde a frecuencias observadas y E_i a las frecuencias esperadas). Valores de $p > 0,05$ fueron considerados no significativos.

3.2.2. Análisis de asociación:

La razón de proporciones ($OR = Odds Ratios$) e intervalos de confianza de 95% fueron utilizados para determinar la asociación entre los polimorfismos/mutaciones y el riesgo a la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama (Tabla 9).

Tabla 9: Distribución de casos y controles para el análisis de asociación.

	Casos	Controles	Total
Expuestos (con SNP) (G/A+A/A)	a	b	m_1
No expuestos (G/G)	c	d	M_0
Total	n_1	n_0	N

Esta medida utiliza la frecuencia relativa de cada genotipo en los casos (a, c) respecto del grupo de referencia (b, d), para cuantificar la magnitud de la asociación (Iniesta *et al.*, 2005).

$$OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{ad}{cb}$$

El OR obtenido en un estudio caso-control indica cuantas veces es mayor (o menor si el SNP actúa como un factor protector) la probabilidad de que los casos presenten el SNP en comparación con los controles. Su valor oscila entre 0 e infinito, un $OR=1$ significa que el SNP no se asocia con la enfermedad; si el OR es menor de uno, en SNP disminuye la posibilidad de desarrollar el evento; y si el OR es mayor de uno, significa que en SNP aumenta la posibilidad de desarrollar el evento (cáncer de mama).

El intervalo de confianza mide la variabilidad de la estimación, cuanto más amplio menor la precisión de la estimación. Un intervalo de confianza que incluye el valor 1 indica que la asociación no es significativa y que el verdadero valor del OR en el universo podría estar sobre o bajo el valor de no asociación (Lazcano Ponce *et al.*, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El riesgo asociado con cada genotípico puede depender del número de copias de la variante, lo que permite definir varios modelos de herencia (tabla 10) posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuación de los genotípicos (Iniesta *et al.*, 2005).

Tabla 10: Codificación de variables indicadoras para evaluar diferentes modelos de herencia.

Genotipo ^a	Codominante		Dominante	Recesivo	Aditivo
	He	Va	Do	Re	Ad
TT	0	0	0	0	0
TC	1	0	1	0	1
CC	0	1	1	1	2

^aGenotipos posibles para un polimorfismo en un locus bialélico T>C

- *Modelo dominante:* supone que una única copia de la variante es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos y homocigotos del alelo menos frecuente (variante) tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos *wild type*.
- *Modelo recesivo:* supone que son necesarias 2 copias de la variante para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos y homocigotos del alelo más frecuente (*wild type*) tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante.
- *Modelo aditivo:* supone que cada copia de la variante modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala logit); por tanto, los homocigotos variantes tienen el doble de riesgo que los heterocigotos. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos y peso 2 a los homocigotos.
- *Modelo codominante.* Es el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (He) y homocigotos variantes (Va) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Este modelo emplea 2 coeficientes (grados de libertad).

Este análisis fue realizado empleando el programa EPIDAT 3.1 (Programa para Análisis Epidemiológicos de Datos Tabulados- Organización Panamericana de la Salud).

3.2.2.1. Análisis de Haplotipos

Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí suele observarse cierto grado de correlación o asociación estadística denominada desequilibrio de ligamiento. Este hecho resulta útil para localizar polimorfismos relacionados con una enfermedad, ya que si aparece una mutación que genera un polimorfismo responsable de la enfermedad, es posible que otros polimorfismos cercanos estén asociados a ella. El conjunto de alelos altamente ligados que se transmiten conjuntamente se denomina haplotipo. Así, para un conjunto de marcadores dados, cada individuo posee dos haplotipos, uno heredado del padre y otro de la madre (Iniesta *et al.*, 2005).

La inferencia de estos haplotipos y su asociación con un rasgo se estima mediante métodos estadísticos basados en el algoritmo esperanza-maximización (EM) y máxima verosimilitud. En los análisis de asociación, el haplotipo más frecuente se toma como referencia y los haplotipos raros generalmente se agrupan en una categoría (con frecuencias < 1%) (Excoffier y Slatkin, 1995).

Para este análisis se utilizó el programa SNPStats¹¹ disponible en línea.

3.2.3. Estimación del efecto combinado de las variantes genéticas en el fenotipo del cáncer de mama

El método de Reducción de Dimensionalidad Multifactorial ó MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*) es un software estadístico que utiliza un modelo no paramétrico y permite detectar interacciones génicas. Examina todas las combinaciones posibles de SNPs de un conjunto dado y elige la combinación que mejor predice el riesgo de enfermedad maximizando la precisión (*accuracy*) de clasificación de casos y controles (Baretta *et al.*, 2008). La base del método del MDR es la construcción de un algoritmo que convierte dos o más variables independientes (polimorfismos) en una sola (combinada) y esta única variable es asociada con la variable dependiente (caso-control). Así, un análisis multivariado pasa a ser uno bivariado.

Por lo tanto, se reduce la dimensionalidad de datos multilocus para detectar combinaciones genéticas que confieren riesgo de enfermedad. Para ello, clasifica los genotipos dentro de grupos de “alto riesgo” y “bajo riesgo” (Figura 20) (Motsinger y Ritchie, 2006).

¹¹ <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El MDR es directamente aplicable a estudios de caso-control y distintos grupos han demostrado que este programa tiene un valioso poder para identificar asociaciones entre dos o más loci en muestras relativamente pequeñas (Ritchie *et al.*, 2001; Lavender *et al.*, 2009).

El software utilizado en este trabajo fue MDR-Permutation Testing Software Overview™ (Dartmouth Medical School, USA). El mismo considera un parámetro denominado prueba de precisión ó TA (*Testing Accuracy*) para determinar cuál es el modelo que mejor se ajusta a las relaciones encontradas. Para ello, se ingresan todas las combinaciones de genotipos de los polimorfismos en estudio y se calcula la relación entre controles y casos. Si no existe interacción entre los genes las combinaciones se distribuyen independientemente, y la probabilidad de encontrar un casillero con mayor número de casos que controles es igual a la probabilidad de que salga cara o cruz al tirar una moneda (TA=0,5). Por lo tanto, como regla, un TA superior a 0,55 es válido para calificar un modelo como posible; si el TA es superior a 0,6, el modelo se considera estadísticamente significativo.

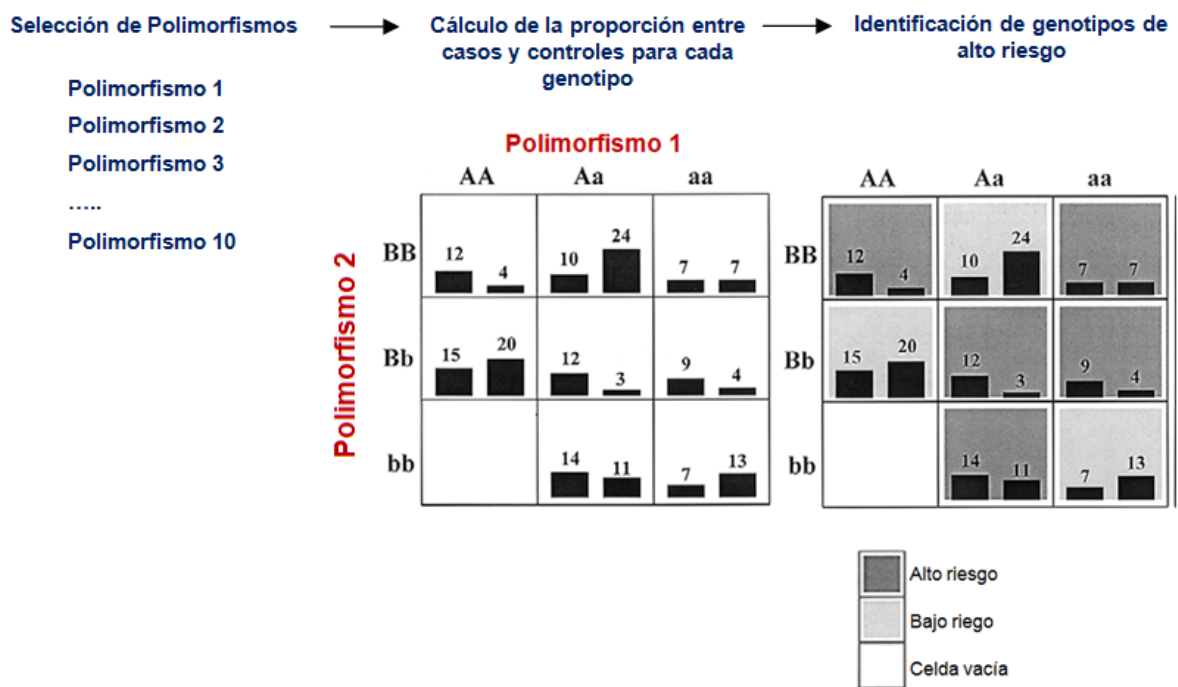


Figura 20: Resumen de los pasos involucrados en la implementación del método MDR. Se muestra la distribución hipotética de casos (barras izquierdas dentro de cada celda) y de controles (barras derechas dentro de cada celda). Tomado y modificado de Ritchie *et al.* 2001.

3.2.3.1. Efectos epistáticos:

Los efectos epistáticos detectados se analizan en un gráfico de interacción y el dendograma construido por el MRD (Figura 21). Este gráfico se construye a partir del

3. MATERIALES Y MÉTODOS

concepto de ganancia de información (basado en medidas de entropía); es decir, se evalúa cuales son las interacciones entre los SNPs analizados que aportan más información sobre la variable clase (caso-control). Una ganancia de información (valor positivo) evidencia una interacción sinérgica entre los SNPs. De lo contrario, cuando la combinación de SNPs muestra una pérdida de información (valor negativo) sugiere redundancia o correlación (por ejemplo cuando existe desequilibrio de ligamiento). Así mismo, si no existe ganancia o pérdida (valor nulo) los SNPs tienen efectos independientes. Los valores de información ganada para cada SNP y para sus combinaciones pareadas son utilizados por el MDR para construir una matriz de distancia, donde los pares de SNPs que presentan una fuerte interacción muestran una menor distancia. A su vez, a partir de esta matriz de distancia se realiza un análisis de *clusters* jerárquicos que resulta en un dendograma de interacción que permite identificar los distintos efectos epistáticos en el análisis MDR. Así, cuánto más corta es la línea que conecta dos atributos (SNPs) más fuerte es la interacción. En ambos esquemas, el color de las líneas indica el tipo de interacción: rojo-naranja, sugieren una relación sinérgica (epistasia); amarillo oscuro sugiere independencia y, verde-azul sugieren redundancia o correlación (Moore, 2013).

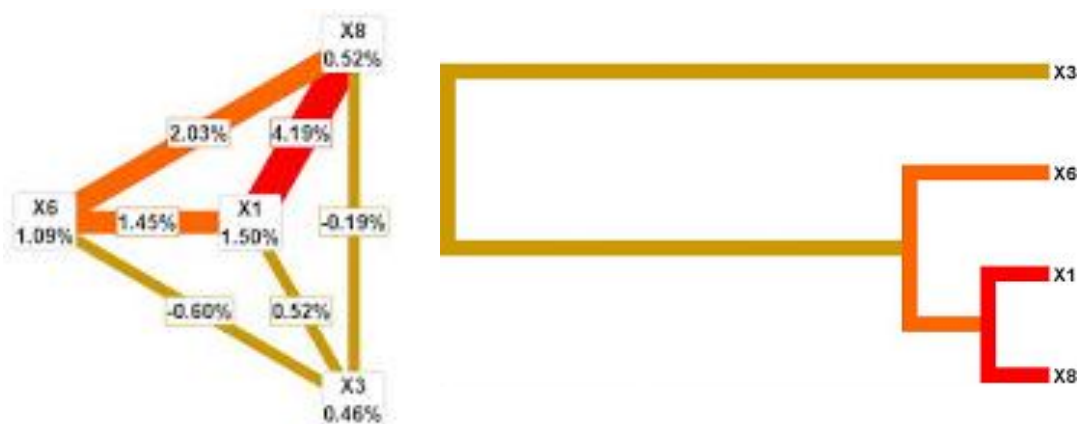


Figura 21. Gráfico (izquierda) y dendograma (derecha) de interacción construido por MDR.

(Tomado de Moore, 2013).

RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS GENÉTICO

Identificación de polimorfismos y mutaciones puntuales en los genes: HER2, ITGa6, ITGβ4, PIK3CA, AKT1, BCL-2 y BAX, en muestras de carcinoma mamario (casos) y sin cáncer (controles).

4.1.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Para el desarrollo del presente trabajo el laboratorio disponía de un total de 87 muestras de carcinoma mamario (casos) y 125 muestras controles. Sin embargo, la relación entre el número de casos y controles analizados difirió para cada variante estudiada, debido a la falta de amplificación de algunas muestras (Tabla 11).

Tabla 11: Número total de muestras analizadas para cada polimorfismo/mutación en estudio.

Genes	SNPs /Mutación	Casos	Controles	Total
HER2	W452C (E16)*	81	95	176
	I655V (E21)	81	122	203
ITGa6	A380T (E7)	85	113	198
ITGβ4	R1281W (E31)	74	117	191
	E542K (E9)	80	116	196
PIK3CA	E545K (E9)	72	115	187
	H1047R / H1047L (E20)	77	124	201
AKT1	E17K - E17Sfs (E3)	71	107	178
BAX	-248 G>A (Pr)**	79	110	189
BCL2	-938 C>A (Pr)	82	119	201

*E=Exón; **Pr=Promotor.

En todas las amplificaciones, se obtuvo un producto de PCR específico siendo verificado como una banda única en geles de agarosa al 2%, sin presencia de bandas inespecíficas u otros artefactos (Figura 22).

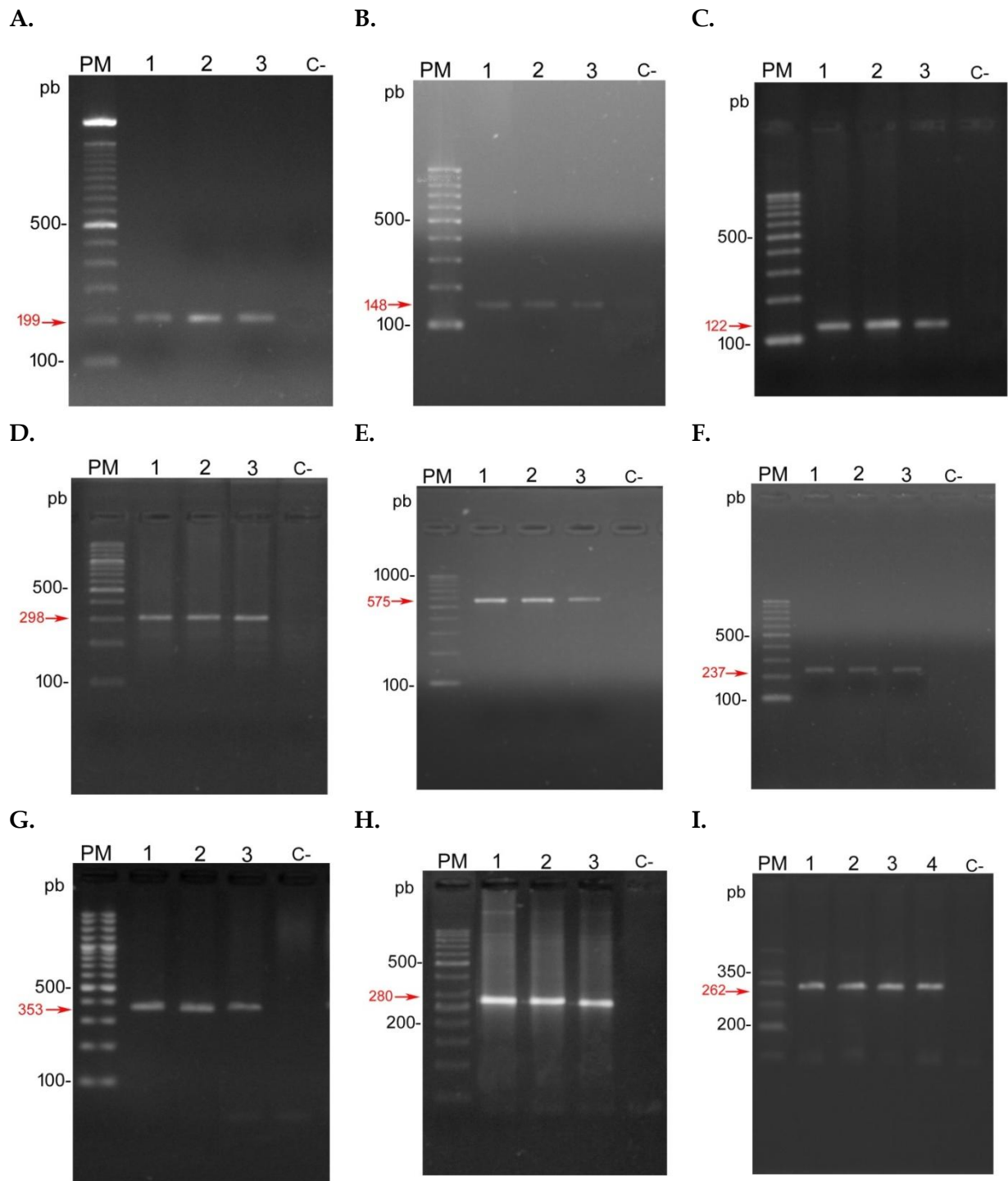


Figura 22. Resultados de amplificación de las 9 regiones de interés. Se observan geles de agarosa al 2%. A. HER2: W452C; B. HER2: I655V; C. ITG α 6: A380T; D. ITG β 4: R1281W; E. PIK3CA: E452K-E545K; F. PIK3CA: H1047R; G. AKT1: E17Sfs-E17K; H. BAX: (-248) G>A; I. BCL2: (-938) C>A. PM: Marcador de peso molecular. C-: Control negativo de PCR.

4.1.2. Análisis de variantes genéticas mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

4.1.2.1. Polimorfismos en *HER2*

4.1.2.1.1. SNP W452C:

Del análisis por RFLP del amplicón de 199pb de *HER-2* obtenido por PCR, se determinaron homocigotas para el alelo *wild type* Trp (G/G) en el 100% de las muestras analizadas (cáncer de mama y controles), observándose en las corridas electroforéticas los fragmentos de 117 y 82pb, tanto en casos como en controles (Figura 1). En ningún caso se observó fragmentos de 199pb correspondientes a los alelos homocigotas Cys (T/T) o heterocigotas Trp/Cys (G/T). Las muestras “dudosas” que parecían mostrar fragmentos no digeridos, fueron corroboradas mediante secuenciación, siendo todos homocigotas para el alelo Trp (G/G) (Figura 23).

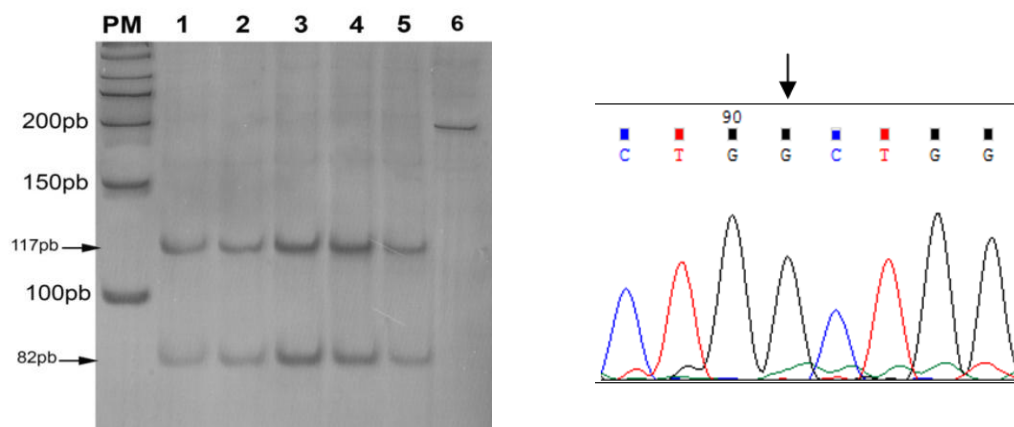


Figura 23. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio del SNP W452C de *HER2*. *Izquierda:* Gel de poliacrilamida al 8% donde se muestran: genotipo homocigota normal Trp (G/G) (carriles 1-5); producto de PCR de 199pb sin digerir (carril 6). PM: marcador de peso molecular de 50pb. *Derecha:* Genotipo homocigota *wild type* GG; la flecha indica la posición del nucleótido G correspondiente a la secuencia normal.

4.1.2.1.2. SNP I655V:

El análisis por RFLP del amplicón de 148pb de *HER2* obtenido por PCR y el análisis de las secuencias del codón 655 se observan en la figura 24.

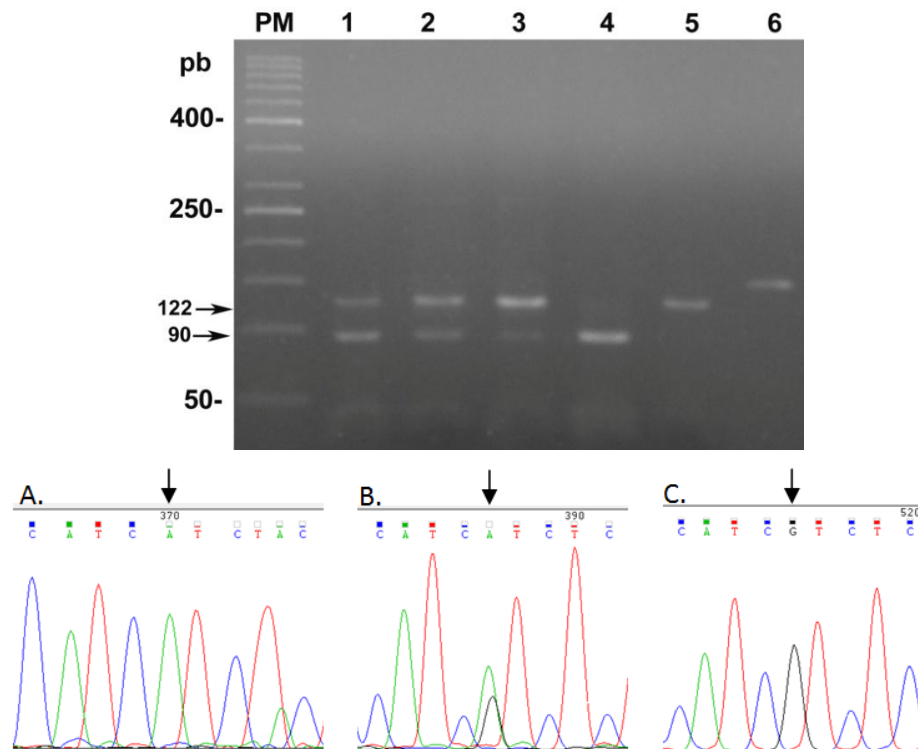


Figura 24. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciaci3n para el estudio del SNP I655V de *HER2*. Arriba: gel de agarosa al 3% donde se muestran: genotipos heterocigota AG (carriles 1-3); homocigota variante GG (carril 4); homocigota normal AA (carril 5); producto de PCR de 148pb sin digerir (carril 6). PM: peso molecular de 50 pb. Abajo: A). Genotipo homocigota normal AA; B). Genotipo heterocigota AG; y C). Genotipo homocigota variante GG. Las flechas indican la posici3n del SNP I655V.

4.1.2.2. Polimorfismos en *ITGa6 β 4*

4.1.2.2.1. SNP A380T de *ITGa6*:

Se realiz3 la digesti3n de los productos de PCR para el polimorfismo A380T con la enzima *Taal*, obteni3ndose el patr3n de bandas esperado y descrito en materiales y m3todos para los distintos genotipos. Se secuenciaron los productos de PCR con bandas representativas para cada patr3n de manera de ratificar la identidad de los fragmentos. De esta manera, se pudo extrapolar al resto de la poblaci3n los resultados de la secuenciaci3n para cada patr3n de digesti3n, conociendo as3 el genotipo de todas las muestras analizadas (Figura 25).

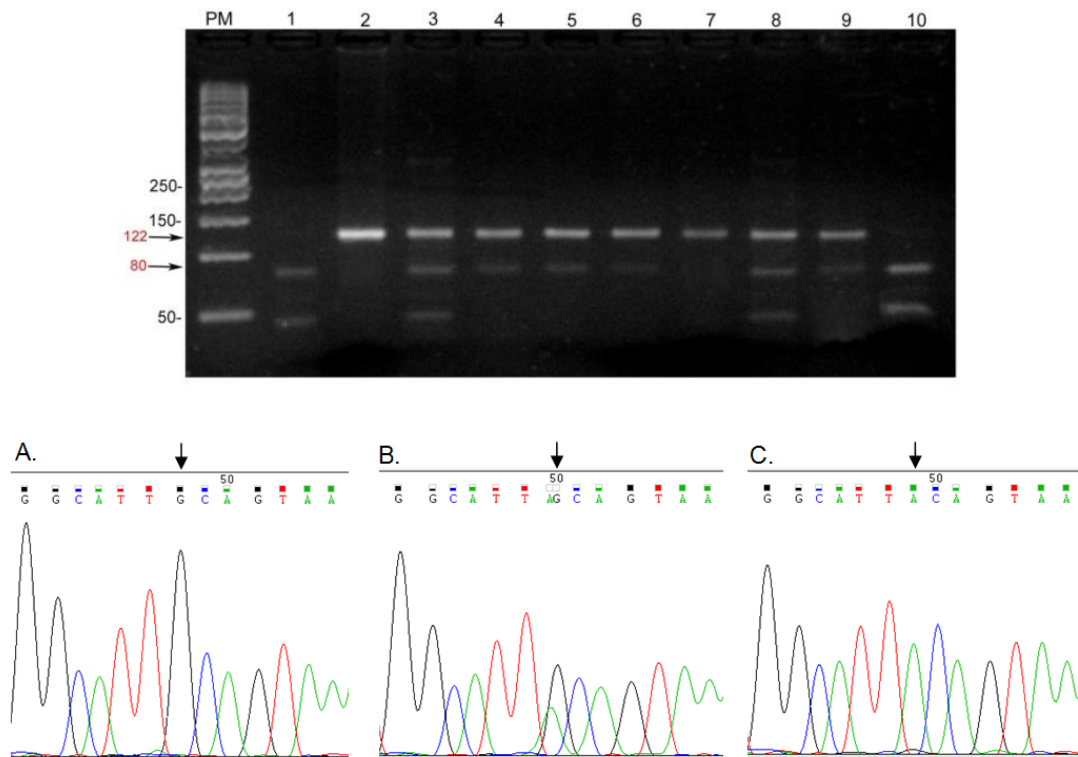


Figura 25. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciaciones para el estudio del SNP A380T de *ITGa6*. Arriba: gel de agarosa al 3% donde se muestran: genotipos homocigota variante AA (carriles 1 y 10); homocigota normal GG (carriles 2 y 7); heterocigota AG (carriles 3, 4, 5, 6, 8 y 9); PM: peso molecular de 50 pb. Abajo: A). Genotipo homocigota normal GG; B). Genotipo heterocigota GA; y C). Genotipo homocigota variante AA. Las flechas indican la posición del SNP.

4.1.2.2.2. Mutación R1281W de *ITGβ4*:

Del análisis por RFLP del amplicón de 298pb obtenido por PCR, se obtuvieron homocigotas para el alelo *wild type* Arg (C/C) en el 100% de las muestras analizadas (casos y controles), observándose en las corridas electroforéticas los fragmentos de 177 y 121 pb. En ningún caso se observó fragmentos correspondientes a los alelos homocigotas Trp (T/T) o heterocigotas Arg/Trp (C/T). Un pool de muestras fueron corroboradas mediante secuenciación, siendo todos homocigotas para el alelo Arg (C/C) (Figura 26).

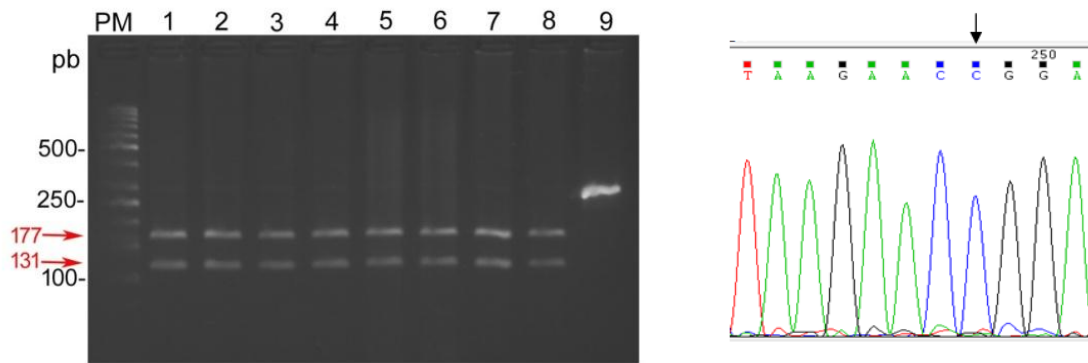


Figura 26. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio del SNP R1281W de *ITGβ4*. *Izquierda:* Gel de agarosa al 3% donde se muestran: genotipo homocigota normal CC (carriles 1-8); producto de PCR de 298pb sin digerir (carril 9). PM: marcador de peso molecular de 50pb. *Derecha:* Genotipo homocigota CC; la flecha indica la posición del nucleótido C correspondiente a la secuencia normal.

4.1.2.3. Mutaciones *hotspot* en *PIK3CA*

4.1.2.3.1. Mutación E542K:

La figura 27 muestra el resultado del análisis de restricción para algunas de las muestras procesadas, en el cual se evidencian tres fragmentos de restricción (103, 228 y 244pb) cuando está presente el genotipo homocigota normal G/G, y cuatro fragmentos (103, 228, 244 y 472pb) para los casos en los que estuvo presente el genotipo heterocigota G/A. Los distintos patrones de bandas obtenidos fueron corroborados por secuenciación para validar los genotipos asignados.

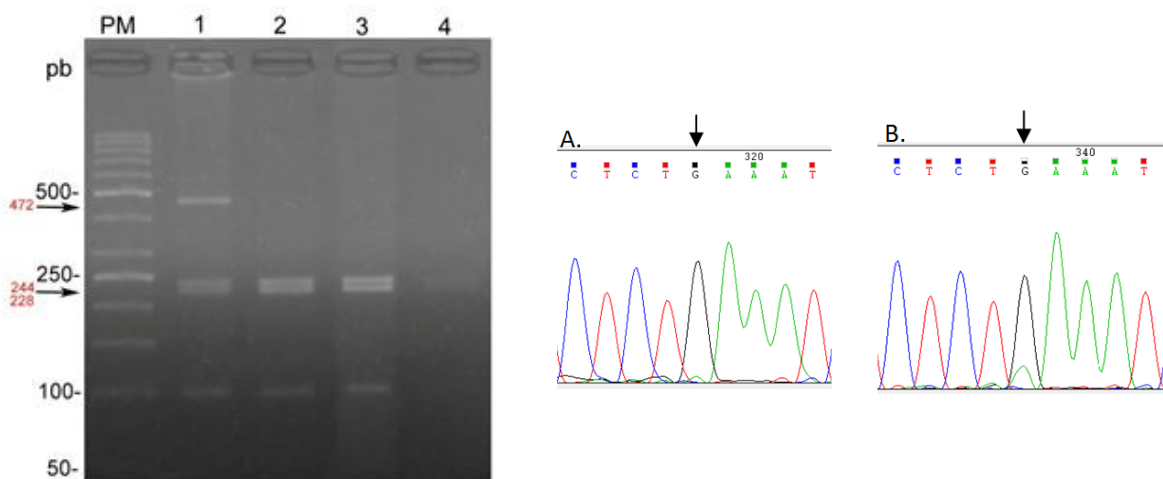


Figura 27. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio de la mutación *hotspot* E542K. *Izquierda:* Gel de agarosa al 3% donde se muestran: genotipo heterocigota GA (carril 1); genotipo homocigota normal GG (carriles 2-4); PM: marcador de peso molecular de 50pb. *Derecha:* A). Genotipo homocigota normal GG; B). genotipo heterocigota GA. Las flechas indican la posición de la mutación.

4.1.2.3.2. Mutación E545K:

La figura 28 muestra el perfil de bandas obtenido luego de la digestión con la enzima *TspRI*. Los genotipos homocigotas G/G fueron evidenciados con fragmentos de 216 y 359pb. Por el contrario, en el caso de individuos heterocigotos G/A, se observaron tres fragmentos de restricción de 216, 359 y 575pb. Los patrones fueron coincidentes con los resultados obtenidos por secuenciación.

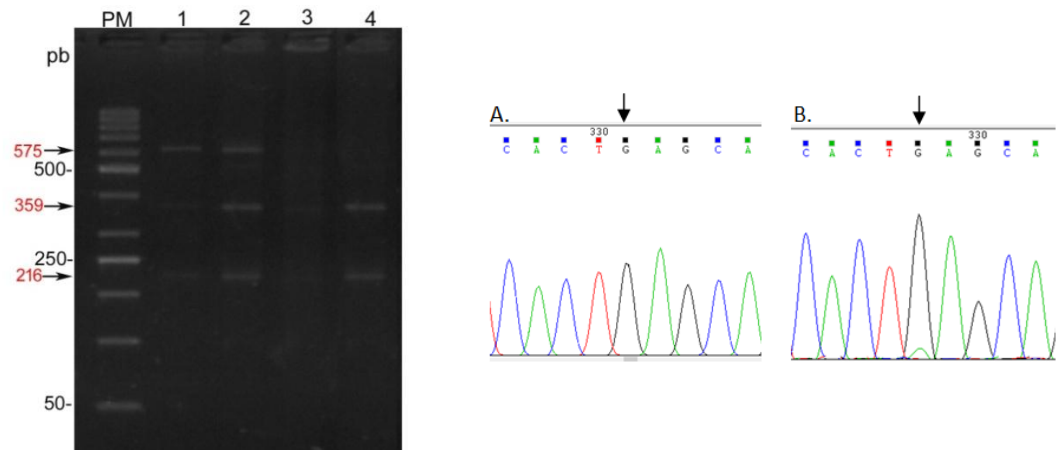


Figura 28. Patrón de bandas obtenido por RFLP y perfil de secuenciación para el estudio de la mutación *hotspot* E545K. *Izquierda:* Gel de agarosa al 3% donde se muestran: genotipo heterocigota GA (carriles 1 y 2); genotipo homocigota normal GG (carriles 3 y 4); PM: marcador de peso molecular de 50pb. *Derecha:* A). Genotipo homocigota normal GG; B). genotipo heterocigota GA. Las flechas indican la posición de la mutación.

4.1.2.3.3. Mutación H1047R:

El análisis de los electroferogramas de todas las muestras secuenciadas tanto del grupo de casos como controles, nos permitió identificar dos mutaciones (A>G y A>T) en el codón 1047 del exón 20 de *PI3KCA* (Figura 29).

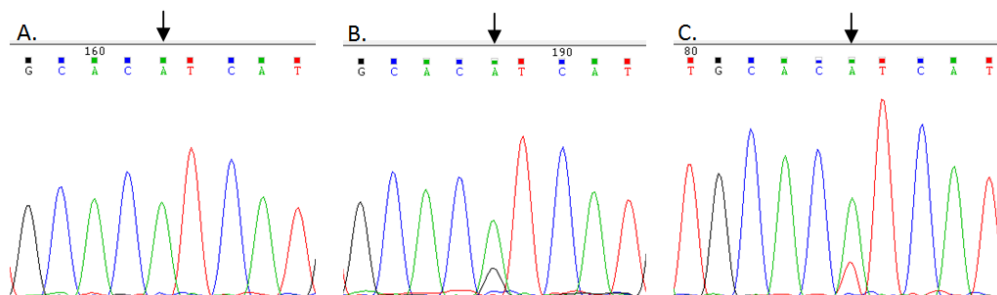


Figura 29. Electroferogramas de los 3 genotipos de H1047R observados en la población analizada. Las flechas indican la posición de la mutación. A: homocigota para el alelo normal His (A/A). B: heterocigota para el alelo His/Arg (A/G). C: heterocigota para el alelo His/Leu (A/T).

4.1.2.4. Mutación E17K en *AKT1*

Mediante el análisis de los electroferogramas de todas las muestras secuenciadas (casos y controles), se logró identificar solamente un caso heterocigota para la mutación E17K (G>A), estando presente el genotipo homocigota normal mayoritariamente (Figura 30).

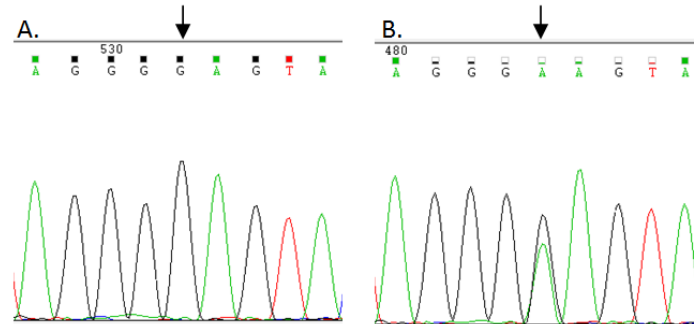


Figura 30. Electroferogramas de los genotipos de E17K observados en la población analizada. Las flechas indican la posición de la mutación. A: homocigota para el alelo normal Glu (G/G). B: heterocigota para el alelo Glu/Lys (G/A).

4.1.2.5. SNP -248 G>A de *Bax*

La figura 31 muestra el patrón de bandas obtenidas mediante la digestión enzimática por *TauI* de algunas muestras. Los distintos patrones de bandas pertenecientes a los genotipos asignados fueron corroborados por secuenciación y extrapolados al resto de la población analizada.

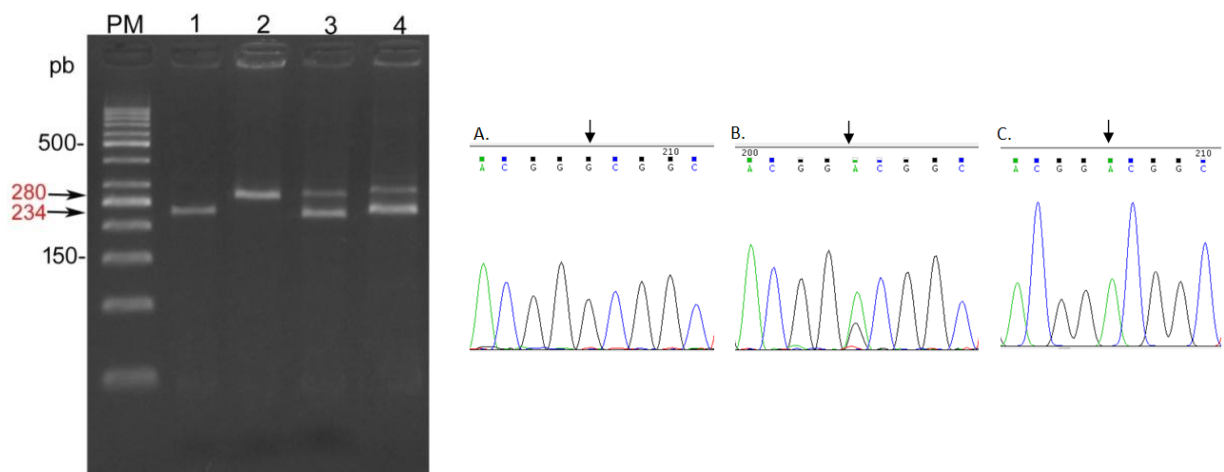


Figura 31. Patrón de bandas obtenido de la digestión con *TauI* y perfil de secuenciaciones para el estudio del SNP -248 G>A de *Bax*. Izquierda: gel de agarosa al 3% donde se muestran: genotipo homocigota normal GG (carril 1); genotipo homocigota variante AA (carril 2) y genotipos heterocigota GA (carriles 3 y 4). PM: peso molecular de 50 pb. Derecha: A). Genotipo homocigota *wild type* GG. B). Genotipo heterocigota GA. C). Genotipo homocigota variante AA.

4.1.2.6. SNP -938C>A de *Bcl-2*

La figura 32 muestra los resultados obtenidos mediante la digestión enzimática por *BclI*, donde se representan los 3 genotipos de *Bcl2* que luego fueron corroborados por secuenciación.

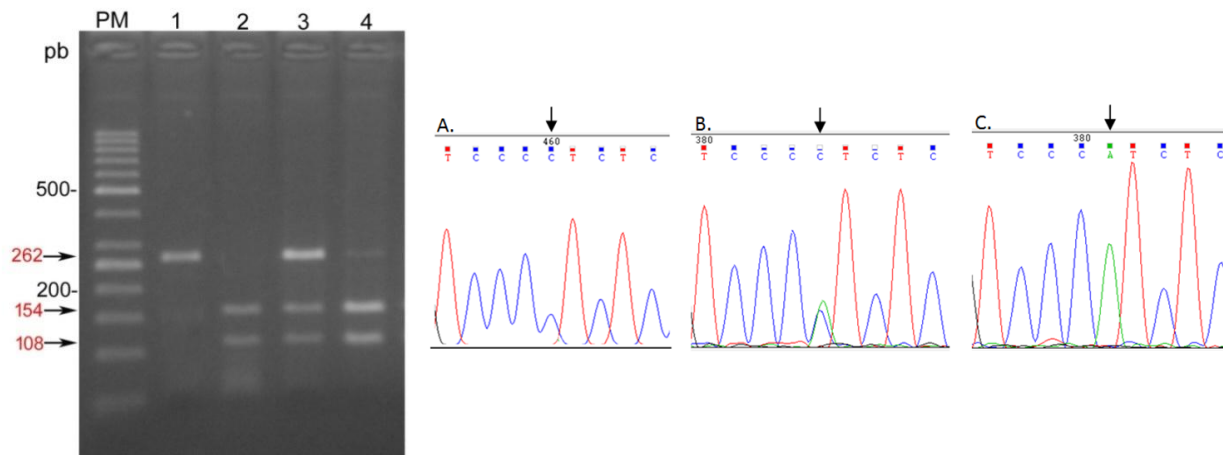


Figura 32. Patrón de bandas obtenido de la digestión con *BclI* y perfil de secuenciaciones para el estudio del SNP -938 C>A de *Bcl-2*. *Izquierda:* gel de agarosa al 3% donde se muestran: genotipo homocigota normal CC (carril 1); genotipo homocigota variante AA (carril 2) y genotipos heterocigota CA (carriles 3 y 4). PM: peso molecular de 50 pb. *Derecha:* A). Genotipo homocigota *wild type* CC. B). Genotipo heterocigota CA. C). Genotipo homocigota variante AA.

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis comparativo de la variabilidad genética observada, evaluación de la asociación entre los SNPs y el cáncer de mama; y estimación del efecto combinado de las variantes genéticas en el fenotipo patológico.

4.2.1. Frecuencias genotípicas y estimación del riesgo de susceptibilidad de desarrollo de cáncer de mama.

4.2.1.1. SNP W452C de *HER2* y mutación R1281W de *ITGβ4*:

En el 100% de las muestras analizadas (casos y controles) se obtuvieron homocigotas para el alelo *wild type* Trp (G/G) y Arg (C/C) para las posiciones aminoacídicas 452 de *HER2* y 1281 de *ITGβ4*, respectivamente.

4.2.1.2. SNP I655V de *HER2*:

La distribución de los genotipos de Ile655Val no reveló desviaciones significativas del Equilibrio de Hardy-Weinberg entre los casos ($\chi^2=0,943$; $p=0,33$) y el grupo control ($\chi^2=2,7202$; $p=0,99$). La prevalencia del genotipo homocigota Val/Val fue del 6% y 7% en los grupos de casos y controles, respectivamente. Se observó una mayor frecuencia de genotipos heterocigotas Ile/Val en el grupo casos en relación al grupo control, alcanzando valores de 38% y 27%, respectivamente (Tabla 12).

Debido a que los OR para los heterocigotos (AG) y homocigotos (GG) con la variante son similares, el modelo dominante de herencia es el que mejor se ajusta al análisis de este polimorfismo (Tabla 12). Así, los individuos en estado homocigota Val/Val o heterocigota Ile/Val presentan un riesgo incrementado pero no están significativamente asociados con el cáncer de mama (OR= 1,58; 95% CI=0,88-2,081, $p=0,1402$).

Tabla 12: Análisis del riesgo del polimorfismo I655V (A>G) en función del modelo de herencia.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	<i>p</i> ^d
		N=81	(%) ^c	N=122	(%) ^c			
Co	AA	45	56	81	66	1		
	AG	31	38	33	27	1,69	0,92-3,11	0,12
	GG	5	6	8	7	1,12	0,34-3,64	1,00
Do	AA	45	56	81	66	1		
	AG+GG	36	44	41	34	1,58	0,88-2,81	0,1402
Re	AA+AG	76	94	114	93	1		
	GG	5	6	8	7	0,93	0,29-2,97	1,00
Ad						1,35	0,84-2,16	0,2243

^aModelos de herencia: codominante (Co), dominante (Do), recesivo (Re), aditivo (Ad).

^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo A>G.

^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje.

^dTest exacto de Fisher.

La distribución del alelo Val en ambos grupos (casos y controles) alcanzó valores de 25% y 20%, respectivamente (Tabla 13). Así mismo, el riesgo en individuos con cáncer de mama portadores del alelo Val es incrementado (OR=1,35), pero no es significativo (95% CI=0,84-2,16; $p=0,2243$), dato avalado por el modelo aditivo (Alelo Val vs alelo Ile).

Tabla 13: Distribución de las frecuencias alélicas del polimorfismo I655V de *HER2* entre individuos con cáncer de mama y controles.

Codón 655 de <i>HER2</i>	Casos <i>n</i> = 81 (%)	Controles <i>n</i> = 122 (%)	OR	95% CI	<i>p</i> ^a
Frecuencias alélicas					
Ile	121 (75)	195 (80)			
Val	41 (25)	49 (20)	1,35 ^b	0,84-2,16 ^b	0,2243 ^b

^a Test exacto de Fisher.

^b Alelo Val *vs* a alelo Ile

Análisis de Estratificación:

El OR ajustado por edad, sitio del tumor, invasión linfovascular, receptor de progesterona (RP), receptor de estrógeno (RE), receptor de *HER2*, grado histológico y período menopáusico, ratificó que no existe asociación entre los genotipos AG y GG con el riesgo de cáncer de mama. Este análisis demuestra que no hay diferencias entre los riesgos estimados entre los estratos (Tabla 14).

Tabla 14: Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de I655V y el riesgo de cáncer de mama

Variables	AG + GG Casos/controles*	AA Casos/controles**	OR ajustado (95% IC)	<i>p</i> ^a
Edad				
< 55 (media)	17	21	1,59 (0,76-3,36)	0,2479
≥ 55 (media)	18	21	1,69 (0,81-3,52)	0,1831
Sitio del tumor				
Ductal	13	20	1,28 (0,58-2,84)	0,5431
Lobular	1	0	-	0,3415
Inv. Linfovascular				
Positivo	18	23	1,55 (0,75-3,18)	0,2625
Negativo	14	13	2,13 (0,91-4,94)	0,0827
RP				
Positivo	13	23	1,12 (0,51-2,43)	0,8423
Negativo	5	4	2,47 (0,63-9,69)	0,2767
RE				
Positivo	17	16	2,09 (0,96-4,57)	0,0697
Negativo	5	7	1,41 (0,42-4,72)	0,7510
HER2				
Positivo	8	11	1,44 (0,54-,3,84)	0,6052
Negativo	14	12	2,30 (0,98-5,43)	0,0729
Grado Histológico				
Grado I	1	6	0,32 (0,04-2,83)	0,4260
Grado II	21	22	1,88 (0,93-3,82)	0,0991
Grado III	12	11	2,15 (0,87-5,30)	0,1026
Periodo				
Menopáusico				
Premenopáusico	11	15	1,45 (0,61-3,44)	0,4978
Posmenopáusico	21	21	1,97 (0,97-4,03)	0,0669

*Controles: AG+GG=41; **Controles: AA=81

^a Ajuste obtenido en modelos de regresión logística

Los resultados se consideran significativos si 95% IC excluye el valor 1 o $p < 0,05$.

4.2.1.3. SNP A380T de *ITGa6*:

La distribución de los genotipos en las poblaciones analizadas no revelaron desviaciones significativas del Equilibrio de Hardy-Weinberg entre los casos ($\chi^2=0,8921$; $p=0,34$) y el grupo control ($\chi^2=0,776$; $p=0,38$). La prevalencia del genotipo homocigota Thr/Thr fue del 8% y 9% en los grupos de casos y controles, respectivamente. Se observó una frecuencia similar de genotipos heterocigotas Ala/Thr en ambos grupos, alcanzando valores de 48% en el grupo casos y 49% en controles (Tabla 15).

El análisis de asociación arrojó un OR= 0,92; 95% CI= 0,52-1,63; $p=0,884$ para el modelo dominante y concordante con los demás. El valor obtenido refleja que no existe asociación entre la variante A380T (G>A) y la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama. Si bien el $OR < 1$ implicaría que la presencia del SNP disminuiría la probabilidad de desarrollar cáncer de mama, esta asociación no es significativa por lo que el verdadero valor de OR podría estar sobre o subestimado.

Tabla 15: Análisis del riesgo del polimorfismo A380T (G>A) en función del modelo de herencia.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	p^d
		N=85	(%) ^c	N=113	(%) ^c			
Co	GG	37	44	47	42	1		
	GA	41	48	55	49	0,94	0,52-1,71	0,881
	AA	7	8	11	9	0,81	0,28-2,29	0,795
Do	GG	37	44	47	42	1		
	GA+AA	48	56	66	58	0,92	0,52-1,63	0,884
Re	GG+GA	78	92	102	91	1		
	AA	7	8	11	9	0,83	0,31-2,24	0,806
Ad						0,92	0,61-1,41	0,747

^aModelos de herencia: codominante (Co), dominante (Do), recesivo (Re), aditivo (Ad). ^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo G>A. ^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje. ^dTest exacto de Fisher.

La distribución del alelo Thr en ambos grupos casos y controles alcanzó valores de 32% y 34%, respectivamente.

Tabla 16: Distribución de las frecuencias alélicas del polimorfismo A380T de *ITGA6* entre individuos con cáncer de mama y controles.

Codón A380T de <i>ITGA6</i>	Casos <i>n</i> = 85 (%)	Controles <i>n</i> = 113 (%)	OR	95% CI	<i>p</i> ^a
Frecuencias alélicas					
Ala	115 (68)	149 (66)			
Thr	55 (32)	77 (34)	0,92 ^b	0,61-1,41 ^b	0,747 ^b

^a Test exacto de Fisher.

^b Alelo Thr *vs* alelo Ala.

Análisis de Estratificación:

El OR ajustado por las variables clínico-patológicas (tabla 17) demostró que no hay diferencias en los riesgos estimados entre los estratos y por lo tanto no existe asociación entre los genotipos GA y AA con el riesgo de cáncer de mama.

Tabla 17: Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de A380T y el riesgo de cáncer de mama

Variables	GA + AA Casos/controles*	GG Casos/controles**	OR ajustado (95% IC)	<i>p</i> ^a
Edad				
< 55 (media)	21	17	1,13 (0,55-2,31)	0,8568
≥ 55 (media)	23	18	0,91 (0,44-1,87)	0,8544
Sitio del tumor				
Ductal	21	13	1,15 (0,52-2,52)	0,8429
Lobular	1	-	-	1,0000
Inv. Linfvascular				
Positivo	24	16	1,07 (0,51-2,22)	1,0000
Negativo	13	12	0,77 (0,32-1,84)	0,6563
RP				
Positivo	21	13	1,15 (0,52-2,52)	0,8429
Negativo	6	5	0,85 (0,25-2,96)	1,0000
RE				
Positivo	22	13	1,21 (0,55-2,63)	0,6968
Negativo	9	3	2,13 (0,55-8,32)	0,3591
HER2				
Positivo	10	9	0,79 (0,29-2,09)	0,8025
Negativo	20	8	1,78 (0,72-4,38)	0,2796
Grado Histológico				
Grado I	4	4	0,71 (0,17-2,99)	0,7199
Grado II	26	18	1,02 (0,51-2,08)	1,0000
Grado III	13	10	0,92 (0,37-2,28)	1,0000
Periodo				
Menopáusico				
Premenopáusico	12	14	0,61 (0,26-1,44)	0,2798
Posmenopáusico	24	17	1,01 (0,48-2,07)	1,0000

*Controles: GA+AA=66; **Controles: GG=47

^a Ajuste obtenido en modelos de regresión logística

Los resultados se consideran significativos si 95% IC excluye el valor 1 o *p*<0,05.

4.2.1.4. Mutación E542K de *PIK3CA*:

La distribución de los genotipos de E542K fue coherente con el Equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,2216$; $p=0,64$ para los casos y $\chi^2=0,3816$; $p=0,54$ para los controles). Se observó que la frecuencia de los heterocigotas Glu/Lys (G/A) fue similar en ambos grupos, siendo de 10%.

La mutación en este locus es rara, no se identificaron genotipos homocigotas Lys/Lys (A/A). Por lo tanto, el riesgo (OR) asociado a la presencia de la variante génica A en el grupo de casos, fue estimado para los genotipos heterocigotas Glu/Lys (G/A) en relación a los genotipos homocigotas Glu/Glu (G/G), siguiendo el modelo codominante (Tabla 18). De este modo, se ha observado que la presencia de una sola copia del alelo A no se asocia al riesgo de cáncer de mama (OR=0,96; 95% CI=0,37-2,47; $p=1,00$).

Tabla 18: Análisis del riesgo de la mutación E542K (G>A) en función del modelo codominante.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	p^d
		N=80	(%) ^c	N=116	(%) ^c			
Co	GG	72	90	104	90	1		
	GA	8	10	12	10	0,96	0,37-2,47	1,00
	AA	-	-	-	-	-	-	-

^aModelo de herencia: codominante (Co). ^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo G>A. ^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje. ^dTest exacto de Fisher.

La distribución del alelo Lys en ambos grupos (caso y controles) fue de 5% (Tabla 19).

Tabla 19: Distribución de las frecuencias alélicas de la mutación E542K de *PIK3CA* entre individuos con cáncer de mama y controles.

Codón 542 de <i>PIK3CA</i>	Casos $n=80$ (%)	Controles $n=116$ (%)	OR	95% CI	p^a
Frecuencias alélicas					
Glu	152 (95)	220 (95)			
Lys	8 (5)	12 (5)	0,96 ^b	0,38-2,41 ^b	1,00 ^b

^a Test exacto de Fisher.

^bAlelo Lys vs a alelo Glu.

Análisis de Estratificación:

El OR ajustado por las variables clínico-patológicas (tabla 20) demostró que no hay diferencias en los riesgos estimados entre los estratos y por lo tanto no existe asociación entre el genotipo GA con el riesgo de cáncer de mama.

Tabla 20: Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de E542K y el riesgo de cáncer de mama

Variables	GA Casos/controles*	GG Casos/controles**	OR ajustado (95% IC)	<i>p</i> ^a
Edad				
< 55 (media)	6	36	1,44 (0,51-4,13)	0,5716
≥ 55 (media)	2	36	0,48 (0,10-2,25)	0,5194
Sitio del tumor				
Ductal	2	33	0,52 (0,11-2,46)	0,5230
Lobular	-	1	-	-
Inv. Linfovascular				
Positivo	3	39	0,66 (0,18-2,48)	0,7607
Negativo	2	24	0,72 (0,15-3,44)	1,0000
RP				
Positivo	3	32	0,81 (0,21-3,05)	1,0000
Negativo	1	8	1,08 (0,12-9,42)	1,0000
RE				
Positivo	2	16	1,08 (0,22-5,29)	1,0000
Negativo	2	13	1,33 (0,27-6,63)	0,6628
HER2				
Positivo	2	18	0,96 (0,19-4,66)	1,0000
Negativo	2	24	0,72 (0,15-3,44)	1,0000
Grado Histológico				
Grado I	1	8	1,08 (0,12-9,42)	1,0000
Grado II	3	37	0,70 (0,18-2,63)	0,7613
Grado III	2	22	0,78 (0,16-3,77)	1,0000
Periodo				
Menopáusico				
Premenopáusico	1	24	0,36 (0,04-2,91)	0,4643
Posmenopáusico	1	37	0,23 (0,03-1,86)	0,1881

*Controles: GA=12; **Controles: GG=104

^a Ajuste obtenido en modelos de regresión logística

Los resultados se consideran significativos si 95% IC excluye el valor 1 o $p < 0,05$.

4.2.1.5. Mutación E545K de *PIK3CA*:

La distribución de los genotipos de E545K no presentaron desviaciones significativas del Equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,2534$; $p=0,62$ para los casos y $\chi^2=0,5615$; $p=0,45$ para los controles). Se observó que la frecuencia de los heterocigotas Glu/Lys (G/A) fue similar en ambos grupos con valores de 11% para casos y 13% para controles.

Al igual que en el caso anterior, no se identificaron genotipos homocigotas Lys/Lys (AA). El riesgo (OR) fue estimado siguiendo el modelo codominante, contrastando los genotipos heterocigotas Glu/Lys (G/A) con los genotipos homocigotas Glu/Glu (G/G),

4. RESULTADOS

(Tabla 21). De este modo, se ha observado que la presencia de una sola copia del alelo A no se asocia al riesgo de cáncer de mama (OR=0,83; 95% CI=0,33-2,07; p=0,8204).

Tabla 21: Análisis del riesgo de la mutación E545K (G>A) en función del modelo codominante.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	p ^d
		N=72	(%) ^c	N=115	(%) ^c			
Co	GG	64	89	100	87	1	0,33-2,07	0,8204
	GA	8	11	15	13	0,83		
	AA	-	-	-	-	-		

^aModelo de herencia: codominante (Co). ^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo G>A. ^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje. ^dTest exacto de Fisher.

La distribución del alelo Lys en ambos grupos (caso y controles) fue de 5% (Tabla 22).

Tabla 22: Distribución de las frecuencias alélicas de la mutación E545K de PIK3CA entre individuos con cáncer de mama y controles.

Codón 545 de PIK3CA	Casos n= 72 (%)	Controles n= 115 (%)	OR	95% CI	p ^a
Frecuencias alélicas					
Glu	136 (94)	215 (93)			
Lys	8 (6)	15 (7)	0,84	0,35-2,04	0,8264

^a Test exacto de Fisher.

^bAlelo Lys vs a alelo Glu.

Análisis de Estratificación:

El OR ajustado por las variables clínico-patológicas (tabla 23) demostró que no hay diferencias en los riesgos estimados entre los estratos y por lo tanto no existe asociación entre el genotipo heterocigota GA de E545K con el riesgo de cáncer de mama.

Tabla 23: Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de E545K y el riesgo de cáncer de mama

Variables	GA Casos/controles*	GG Casos/controles**	OR ajustado (95% IC)	p ^a
Edad				
< 55 (media)	5	29	1,15 (0,38-3,43)	0,7793
≥ 55 (media)	2	34	0,39 (0,08-1,80)	0,3637
Sitio del tumor				
Ductal	4	23	1,15 (0,35-3,82)	0,7598
Lobular	-	1	-	-
Inv. Linfovacular				

4. RESULTADOS

Positivo	5	33	1,01 (0,34-2,99)	1,0000
Negativo	1	23	0,28 (0,03-2,31)	0,3058
RP				
Positivo	3	28	0,71 (0,19-2,64)	0,7647
Negativo	1	8	0,83 (0,09-7,14)	1,0000
RE				
Positivo	2	25	0,53 (0,11-2,48)	0,5283
Negativo	1	10	0,66 (0,08-5,58)	1,0000
HER2				
Positivo	1	17	0,39 (0,05-3,16)	0,6958
Negativo	2	19	0,70 (0,15-3,32)	1,0000
Grado Histológico				
Grado I	2	5	2,66 (0,47-15,00)	0,2518
Grado II	1	34	0,19 (0,02-1,54)	0,1195
Grado III	3	20	1,00 (0,26-3,77)	1,0000
Periodo				
Menopáusico				
Premenopáusico	2	20	1,33 (0,40-4,43)	0,7434
Posmenopáusico	2	32	0,42 (0,09-1,92)	0,3618

*Controles: GA=15; **Controles: GG=100

^a Ajuste obtenido en modelos de regresión logística

Los resultados se consideran significativos si 95% IC excluye el valor 1 o $p < 0,05$.

4.2.1.6. Mutación H1047R de PIK3CA:

La distribución de los genotipos de H1047R fue coherente con el Equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,455$; $p=0,5$ para los casos y $\chi^2=0,00023$; $p=0,98$ para los controles). La frecuencia de heterocigotas His/Arg (A/G) difirió ampliamente entre ambos grupos, con valores de 15% para los casos y 1% en los controles.

Debido a que no se identificaron genotipos homocigotas Arg/Arg (G/G), el riesgo (OR) asociado a la presencia de la variante génica G en el grupo de casos, fue estimado para los genotipos heterocigotas His/Arg (A/G) en relación a los genotipos homocigotas His/His (A/A), siguiendo el modelo codominante (Tabla 24). De este modo, se ha observado que una sola copia de la variante G se asocia al riesgo de susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama (OR=21,14; 95% IC=2,67-167,4; $p < 0,0001$).

Tabla 24: Análisis del riesgo de la mutación H1047R (A>G) en función del modelo de herencia.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	p^d
		N=75	(%) ^c	N=124	(%) ^c			
Co	AA	64	85	123	99	1		
	AG	11	15	1	1	21,14	2,67-167,4	<0,0001
	GG	-	-	-	-	-	-	-

^aModelo de herencia: codominante (Co). ^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo A>G.

^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje. ^dTest exacto de Fisher.

4. RESULTADOS

La distribución del alelo Arg presentó grandes discrepancias entre el grupo de casos (7%) y controles (0,4%) (Tabla 25). Teniendo en cuenta el número de cromosomas, se ratifica que el riesgo en individuos con cáncer de mama portadores del alelo Arg es incrementado (OR=19,54; 95% CI=2,49-153,0; p<0,0001).

Tabla 25: Distribución de las frecuencias alélicas de la mutación H1047R de PIK3CA entre individuos con cáncer de mama y controles.

Codón 1047 de PIK3CA	Casos n= 75 (%)	Controles n= 124 (%)	OR	95% CI	p ^a
Frecuencias alélicas					
His	139 (93)	247 (99,5)			
Arg	11 (7)	1 (0,403)	19,54^b	2,49-153,0^b	<0,0001^b

^a Test exacto de Fisher.

^b Alelo Arg vs a alelo His.

Por otra parte, para el cambio de A>T en el codón 1047 de PIK3CA (H1047L), la frecuencia del alelo Leu en el grupo de casos fue del 2% y nula en el grupo de controles; razón por la cual no se pudo realizar el estudio de asociación.

Tabla 26: Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de la mutación H1047L de PIK3CA entre individuos con cáncer de mama y controles.

Codón 1047 de PIK3CA	Casos n= 66 (%)	Controles n= 124 (%)	OR	95% CI	p
Frecuencias genotípicas					
His/His	64 (97)	124 (100)			
His/Leu	2 (3)	- (-)	-	-	-
Leu/Leu	-	-			
Frecuencias alélicas					
His	130 (98)	248 (100)			
Leu	2 (2)	- (-)	-	-	-

Sin embargo, el riesgo asociado a la presencia de cualquiera de las dos variantes (G ó T) en la posición 1047 en individuos con cáncer de mama es incrementado y significativo (Tabla 27).

Tabla 27: Análisis del riesgo de la mutación H1047R/L (A>K*) en función del modelo de herencia.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	p ^d
		N=77	(%) ^c	N=124	(%) ^c			
Co	AA	64	85	123	99	1		
	AG ó AT	13	15	1	1	24,98	3,19-195,3	<0,001

*K=G ó T

^aModelo de herencia: codominante (Co). ^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo A>G ó T. ^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje. ^dTest exacto de Fisher.

Análisis de Estratificación:

El OR ajustado por las variables clínico-patológicas (tabla 28) demostró que no hay diferencias en los riesgos estimados entre los estratos excepto para los pacientes con invasión linfovascular negativa. Se ratifica así que existe una fuerte asociación entre el genotipo AG con el riesgo de cáncer de mama.

Tabla 28: Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de H1047R y el riesgo de cáncer de mama

Variables	AG Casos/controles*	AA Casos/controles**	OR ajustado (95% IC)	<i>p</i> ^a
Edad				
< 55 (media)	5	32	19,21 (2,16-170,35)	0,0026
≥ 55 (media)	6	29	25,45 (2,94-219,63)	0,0005
Sitio del tumor				
Ductal	4	25	19,68 (2,11-183,58)	0,0047
Lobular	1	-		0,0160
Inv. Linfovascular				
Positivo	8	28	35,14 (4,22-292,48)	<0,0001
Negativo	2	23	10,69 (0,93-122,88)	0,0731
RP				
Positivo	5	28	21,96 (2,47-195,45)	0,0016
Negativo	2	7	35,14 (2,83-436,06)	0,0119
RE				
Positivo	5	24	25,62 (2,86-229,22)	0,0009
Negativo	2	12	20,5 (1,73-242,98)	0,0272
HER2				
Positivo	2	14	17,57 (1,49-206,35)	0,0345
Negativo	5	20	30,75 (3,41-277,08)	0,0005
Grado Histológico				
Grado I	2	15	16,40 (1,40-191,87)	0,0384
Grado II	5	20	30,75 (3,41-277,08)	0,0005
Grado III	4	27	18,22 (1,96-169,55)	0,0058
Periodo				
Menopáusico				
Premenopáusico	4	22	22,36 (2,38-209,60)	0,0032
Posmenopáusico	7	27	31,88 (3,76-270,03)	<0,0001

*Controles: AG=1; **Controles: AA=123

^a Ajuste obtenido en modelos de regresión logística

Los resultados se consideran significativos si 95% IC excluye el valor 1 o $p < 0,05$.

4.2.1.6.1. Análisis de haplotipos de las mutaciones *hotspots* de *PIK3CA* y su asociación con el cáncer de mama.

El haplotipo más frecuente (GGA) tanto en casos como en controles está presente en casi el 90% de la población (Tablas 29 y 30). El cuarto haplotipo en frecuencia contiene

4. RESULTADOS

variantes para las mutaciones A>G y A>K en la posición 1047. Estos haplotipos son los únicos que muestran un riesgo aumentado significativo y recogen la información observada en el análisis de los genotipos por separado. Así, los casos que presentan los haplotipos GGG y/o GGK tienen mayor probabilidad de desarrollar cáncer de mama.

Tabla 29: Análisis de haplotipos para las mutaciones E542K, E545K y H1049R y su asociación con el cáncer de mama

Haplotipo	Locus			Fra ^a	OR (IC del 95%)	p ^b
	E542K	E545K	H1047R			
Hap 1	G	G	A	0,8664	1.00	---
Hap 2	G	A	A	0,0505	0,45 (0,13-1,52)	0,2
Hap 3	A	G	A	0,0458	0,77 (0,26-2,28)	0,64
Hap 4	G	G	G	0,0265	16,91 (2,03-141,11)	0,0096
Raros	*	*	*	0,0108	>>>1 (>>1 - >>1)	<0,0001

Valor p para asociación global del haplotipo: 0,00027

^a Frecuencia estimada de cada haplotipo.

^b p del test que compara cada haplotipo con frecuencia superior al 1% con el más frecuente (Hap 1)

Tabla 30: Análisis de haplotipos para las mutaciones E542K, E545K y H1049R/L y su asociación con el cáncer de mama

Haplotipo	Locus			Fra	OR (IC del 95%)	p ^b
	E542K	E545K	H1047R/L			
Hap 1	G	G	A	0,8644	1.00	---
Hap 2	G	A	A	0,0489	0,38 (0,11-1,36)	0,14
Hap 3	A	G	A	0,0457	0,78 (0,27-2,30)	0,66
Hap 4	G	G	K**	0,0287	18,98 (2,29-157,39)	0,0069
Raros	*	*	*	0,0124	>>>1 (>>1 - >>1)	<0,0001

Valor p para asociación global del haplotipo: <0,0001

^a Frecuencia estimada de cada haplotipo.

^b p del test que compara cada haplotipo con frecuencia superior al 1% con el más frecuente (Hap 1)

**K=G ó T

4.2.1.7. Mutación E17K de *AKT1*:

El cambio de G>A en el codón 17 del exón 3 de *AKT* que resulta en un cambio de residuo Glu a Lys (E17K) es poco frecuente y sólo se ha observado un caso heterocigota variante (Tabla 31). Debido a que en el grupo de controles no se ha detectado la mutación no se realizó el estudio de asociación con la enfermedad.

Así mismo, no se detectó la delección del nucleótido G (delG) que provoca un cambio de lectura en la misma posición (E17Sfs).

Tabla 31: Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de la mutación E17K de AKT entre individuos con cáncer de mama y controles.

Codón 17 de AKT	Casos n= 71 (%)	Controles n= 107 (%)	OR	95% CI	p
Frecuencias genotípicas					
Glu/Glu	70 (99)	107 (100)			
Glu/Lys	1 (1)	- (-)	-	-	-
Lys/Lys	-	-			
Frecuencias alélicas					
Glu	141 (99,3)	215 (100)			
Lys	1 (0,7)	- (-)	-	-	-

La falta de representantes portadores de la variante E17K tanto en el grupo de casos como en controles tampoco permitió el análisis por estratificación por variables clínico-patológicas.

4.2.1.8. SNP -248 G>A de Bax

La distribución de las frecuencias genotípicas fue coherente con el equilibrio de Hardy-Weinberg con valores de $\chi^2= 1,887$; $p= 0,1715$ para los casos y $\chi^2 =1,785$ y $p= 0,1833$ para los controles. La frecuencia de heterocigotas GA fue mayoritaria en ambos grupos (52% para casos y 44% en controles). En la tabla 32 se presentan los 4 modelos principales de riesgo posibles. El modelo codominante muestra que sólo los individuos AA presentan un riesgo disminuido. Los heterocigotos GA tienen un riesgo cercano al de los homocigotos GG, lo que sugiere que el modelo recesivo es el adecuado. Por lo tanto, los portadores del genotipo AA presentan menor probabilidad de desarrollar cáncer de mama (OR=0,2; 95% CI=0,08-0,51; $p=0,0002$).

Tabla 32: Análisis del riesgo del SNP -248 G>A de Bax en función del modelo de herencia.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	p ^d
		N=79	(%) ^c	N=110	(%) ^c			
Co	GG	32	40	30	27	1		
	GA	41	52	48	44	0,8	0,42-1,53	0,5132
	AA	6	8	32	29	0,18	0,06-0,48	0,0003
Do	GG	32	41	30	27	1		
	GA+AA	47	59	80	73	0,55	0,29-1,02	0,0612
Re	GG+GA	73	92	78	71	1		
	AA	6	7	32	29	0,2	0,08-0,51	0,0002
Ad						0,48	0,32-0,74	0,0011

4. RESULTADOS

^aModelos de herencia: codominante (Co), dominante (Do), recesivo (Re), aditivo (Ad). ^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo G>A. ^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje. ^dTest exacto de Fisher.

Se observó diferencias en la distribución del alelo A entre el grupo de casos (34%) y controles (51%) (Tabla 33). Teniendo en cuenta el número de cromosomas, se ratifica que la probabilidad de desarrollar el cáncer de mama de individuos portadores del alelo A es menor (OR=0,48; 95% CI=0,32-0,74; p=0,0011) si en el grupo de referencia (controles) su presencia es al azar.

Tabla 33: Distribución de las frecuencias alélicas del SNP -248 G>A de Bax entre individuos con cáncer de mama y controles.

Pos -248 Promotor Bax	Casos n= 79 (%)	Controles n= 110 (%)	OR	95% CI	p ^a
Frecuencias alélicas					
G	105 (66)	108 (49)			
A	53 (34)	112 (51)	0,48^b	0,32-0,74^b	0,0011^b

^a Test exacto de Fisher.

^bAlelo A vs alelo G.

Análisis de Estratificación:

El OR ajustado por las variables clínico-patológicas mostró que no hay diferencias significativas entre los riesgos estimados entre los estratos excepto para los pacientes con invasión linfocelular negativa; receptores de progesterona y estrógeno negativos; receptor HER2 positivo y grado histológico I. Por lo tanto, se ratifica la asociación entre el genotipo homocigota AA con una menor susceptibilidad de desarrollar de cáncer de mama (Tabla 34).

Tabla 34: Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de Bax y el riesgo de cáncer de mama

VARIABLES	AA Casos/controles*	GG + GA Casos/controles**	OR ajustado (95% IC)	p ^a
Edad				
< 55 (media)	1	37	0,06 (0,01-0,50)	0,0005
≥ 55 (media)	5	34	0,07 (0,01-0,53)	0,0005
Sitio del tumor				
Ductal	1	35	0,07 (0,01-0,53)	0,0005
Lobular	-	1	-	-
Inv. Linfocelular				
Positivo	1	39	0,06 (0,01-0,47)	0,0002
Negativo	4	22	0,44 (0,14- 1,38)	0,2171
RP				
Positivo	3	30	0,24 (0,07-0,85)	0,0206
Negativo	1	9	0,27 (0,03-2,27)	0,2815

4. RESULTADOS

RE					
	Positivo	2	28	0,17 (0,04-0,77)	0,0146
	Negativo	2	12	0,41 (0,08-1,91)	0,3466
HER2					
	Positivo	2	16	0,30 (0,06- 1,40)	0,1519
	Negativo	2	24	0,20 (0,04-0,91)	0,0238
Grado Histológico					
	Grado I	1	8	0,30 (0,03-2,53)	0,4415
	Grado II	4	39	0,25 (0,08-0,75)	0,0104
	Grado III	-	20	-	-
Periodo					
Menopáusico					
	Premenopáusico	1	26	0,09 (0,01-0,72)	0,0048
	Posmenopáusico	4	34	0,28 (0,09- 0,87)	0,0272

*Controles: GA+AA=80; **Controles: GG=30

^a Ajuste obtenido en modelos de regresión logística

Los resultados se consideran significativos si 95% IC excluye el valor 1 o $p < 0,05$.

4.2.1.9. SNP -938 C>A de Bcl-2

Las frecuencias genotípicas no presentaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,8006$; $p = 0,372$ para los casos y $\chi^2 = 1,519$; $p = 0,22$ para los controles).

Al igual que en el caso anterior, la frecuencia observada de genotipos heterocigotas (CA) es elevada tanto en casos (55%) como controles (41%).

El polimorfismo A muestra una asociación fuerte con el cáncer de mama y las OR crecientes indican que el modelo aditivo es el que mejor se ajusta al análisis (Tabla 35). Es decir, la presencia del SNP -398A aumenta 1.69 veces el riesgo de susceptibilidad de desarrollo del cáncer de mama respecto de aquellos individuos que no lo presentan (OR=1,69; 95% IC=1,13-2,54; $p=0,0134$).

Tabla 35: Análisis del riesgo del SNP -938 C>A de Bcl2 en función del modelo de herencia.

Modelo ^a	Genotipo ^b	Casos		Controles		OR	IC del 95%	p^d
		N=82	(%) ^c	N=119	(%) ^c			
Co	CC	19	23	51	43	1		
	CA	45	55	49	41	2,46	1,27-4,79	0,0094
	AA	18	22	19	16	2,54	1,11-5,85	0,0333
Do	CC	19	23	51	43	1		
	CA+AA	63	77	68	57	2,48	1,33-4,66	0,0043
Re	CC+CA	64	78	100	84	1		
	AA	18	22	19	16	1,48	0,72-3,03	0,3547

Ad **1,69 1,13-2,54 0,0134**

^aModelos de herencia: codominante (Co), dominante (Do), recesivo (Re), aditivo (Ad). ^bGenotipos y sus agrupaciones para el polimorfismo G>A. ^cFrecuencias genotípicas expresadas en porcentaje. ^dTest exacto de Fisher.

La frecuencia del alelo A fue mayor en el grupo de casos en relación a los controles, 49% y 37%, respectivamente (Tabla 36).

Tabla 36: Distribución de las frecuencias alélicas del SNP -938 C>A de Bcl2 entre individuos con cáncer de mama y controles.

Pos -938 Promotor Bcl2	Casos n= 82 (%)	Controles n= 119 (%)	OR	95% CI	p ^a
Frecuencias alélicas					
C	83 (51)	151 (63)			
A	81 (49)	87 (37)	1,69^b	1,13-2,54^b	0,0134^b

^a Test exacto de Fisher.

^bAlelo A vs alelo C

Análisis de Estratificación:

Los riesgos estimados mostraron diferencias entre los estratos (Tabla 36); siendo significativo en los casos con edad menor a 55 años, invasión linfovascular positiva, receptor de HER2 negativo, grado histológico II y periodo menopáusico sin distinción (pre y post-menopáusico).

Tabla 36: Análisis de estratificación para asociaciones entre los genotipos de Bcl2 y el riesgo de cáncer de mama

Variables	CA + AA Casos/controles*	CC Casos/controles**	OR ajustado (95% IC)	p ^a
Edad				
< 55 (media)	32	8	3,00 (1,27- 7,05)	0,0133
≥ 55 (media)	30	11	2,04 (0,93-4,46)	0,0939
Sitio del tumor				
Ductal	24	10	1,8 (0,79-4,09)	0,1710
Lobular	-	1	-	-
Inv. Linfovascular				
Positivo	32	9	2,66 (1,17- 6,07)	0,0241
Negativo	21	7	2,25 (0,88-5,69)	0,0903
RP				
Positivo	25	10	1,87 (0,82-4,24)	0,1690
Negativo	5	3	1,25 (0,28-5,47)	1,0000
RE				
Positivo	22	11	1,5 (0,66-3,37)	0,4238
Negativo	11	2	4,12 (0,87- 19,43)	0,0742

4. RESULTADOS

HER2				
Positivo	11	9	0,91 (0,35-2,37)	1,0000
Negativo	23	3	5,75 (1,63-20,20)	0,0030
Grado Histológico				
Grado I	5	3	1,25 (0,28- 5,47)	1,0000
Grado II	33	9	2,75 (1,21- 6,25)	0,0157
Grado III	17	5	2,55 (0,88- 7,36)	0,0979
Periodo				
Menopáusico				
Premenopáusico	22	6	2,75 (1,04- 7,27)	0,0512
Posmenopáusico	31	10	2,32 (1,04-5,17)	0,0411

*Controles: CA+AA=68; **Controles: CC=51

^a Ajuste obtenido en modelos de regresión logística

Los resultados se consideran significativos si 95% IC excluye el valor 1 o $p < 0,05$.

4.2.2. Estimación del efecto combinado de las variantes genéticas en el fenotipo del cáncer de mama

4.2.2.1. Estimación de la interacción entre todos los SNPs estudiados

Mediante el método de reducción de dimensionalidad multifactorial (MDR) se evaluó todas las combinaciones posibles entre los 7 SNPs cuyas frecuencias alélicas y genotípicas fueron coherentes con el EHW: I655V, A380T, E542K, E545K, H1047R, -248G>A y -938C>A, para la identificación de las combinaciones de polimorfismos asociados al cáncer de mama.

Para este conjunto de datos, el modelo de cuatro-factores (cuatro-*loci*) conformado por *HER2-ITGa6-BAX-BCL2* fue estadísticamente significativo y el que mostró mayor precisión (TA) (Tabla 37). La consistencia del análisis fue óptima (Consistencia de validación cruzada= 10/10). Las combinaciones de genotipos asociadas con el riesgo de cáncer de mama y la distribución de casos y controles para cada combinación se muestran en la figura 33.

Tabla 37: Análisis de reducción de dimensión multifactorial (MDR)*

Comparación**	Mejor modelo en cada dimensión	TA	CVC	<i>p</i>
Controles <i>vs</i> Casos	H1047R (PIK3CA)	0,5533	6/10	0,6018
	I655V (HER2); -248A (Pr Bax)	0,7651	10/10	0,0171
	I655V (HER2); H1047R (PIK3CA); -248A (Pr Bax)	0,7945	10/10	0,0082
	I655V (HER2); A380T (ITGa6); -248A (Pr Bax); -938A (Pr Bcl2)	0,8188	10/10	0,0021

*Selección de la mejor combinación de genotipos por el método MDR. TA=*testing accuracy* (prueba de precisión); CVC=*cross-validation consistency*, consistencia de validación cruzada.

**Controles=85; Casos=124

En negrita el mejor modelo con un TA máximo y un CVC > 5 de 10 para la comparación.

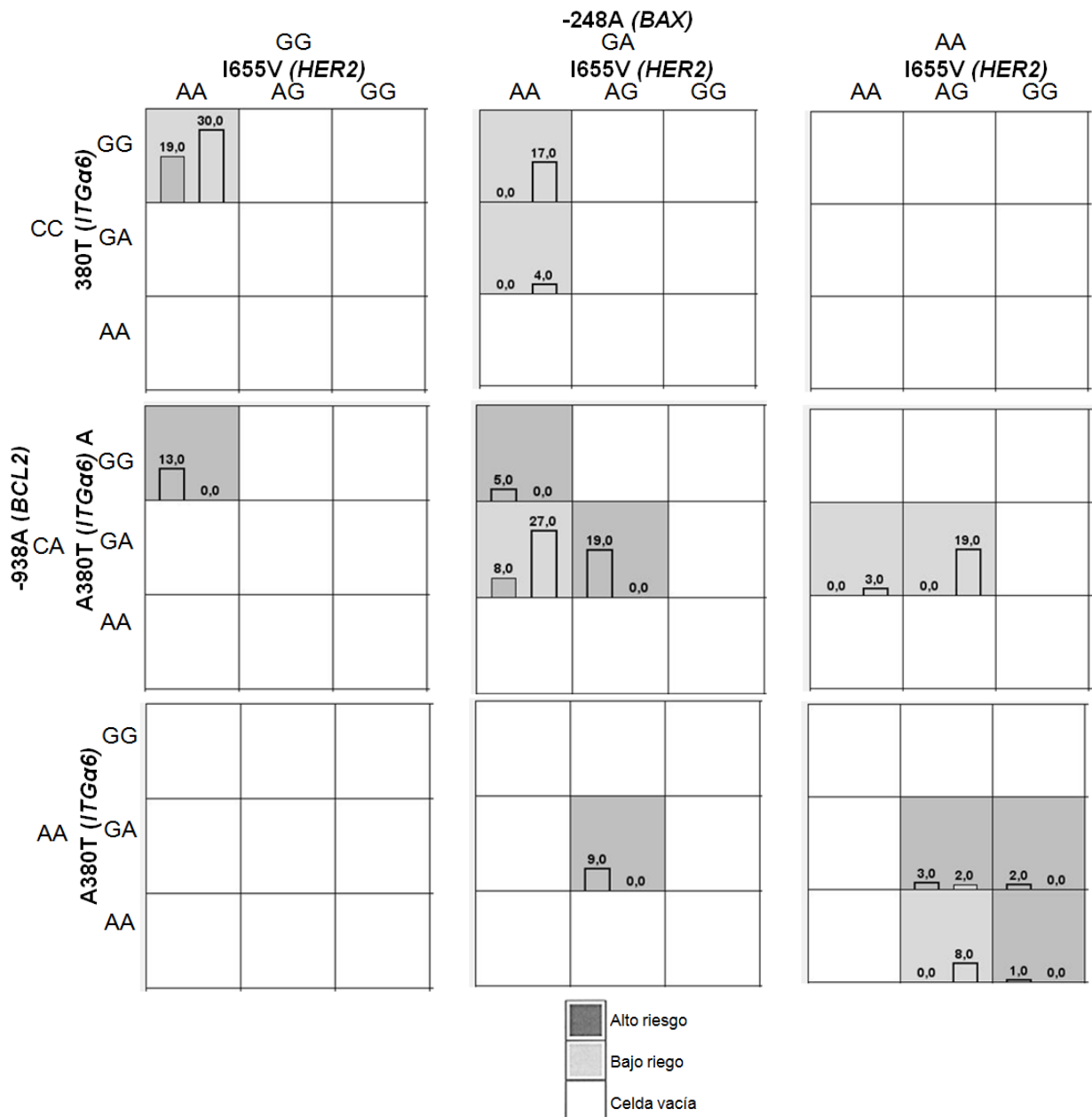


Figura 33. Resultados del análisis de MDR para las interacciones genotípicas de los SNPs en estudio y su asociación con el cáncer de mama. En este modelo cuatro-loci (cuatro-factores), cada combinación de genotipos multilocus es considerado de alto riesgo cuando la proporción de casos *vs* controles excede un umbral igual a la proporción de casos *vs* controles en cada población ($T=0,6855$), de lo contrario es clasificado como de bajo riesgo. Las combinaciones de “alto riesgo” están representadas por celdas grises oscuros y las de “bajo riesgo” por celdas grises claros. Para cada celda, la barra izquierda indica el número de casos y la derecha los controles.

Además, se realizó un análisis de entropía para evaluar qué tipo de efectos estaban representados en este modelo de cuatro-factores. En el gráfico de entropía resultante de este análisis cada nodo representa un SNP, y el valor de entropía la fuerza del efecto principal o individual de dicho SNP. La línea que conecta dos SNPs y su valor de entropía representan la interacción entre estos dos polimorfismos y la fuerza de esta interacción. Los valores negativos de entropía que se encuentran en el gráfico, indican que existe una pérdida de

4. RESULTADOS

información como resultado de redundancia y/o correlación entre los genes (por ejemplo la existencia de desequilibrio de ligamiento entre ellos). Es decir, cuando un grupo de SNPs se heredan juntos (haplotipos) debido al alto desequilibrio de ligamiento (LD) tiende a haber información redundante; por lo tanto, si la información aportada por un SNP en una red genética se repite, la ausencia de éste tendría poco efecto sobre el fenotipo (Wagner, 2005). Un valor positivo de entropía indica una ganancia de información o sinergia, lo cual representa interacciones no aditivas entre los genes (Figura 34 y 35). En el gráfico se observa una fuerte interacción entre los SNPs de *HER2*, *BAX*, *ITGa6* y *BCL2* representado por un valor positivo de entropía. Esto indicaría una interacción sinérgica entre estos polimorfismos en relación al riesgo de desarrollo de la enfermedad. Si bien, en el análisis de asociación de los SNPs por separado tanto el polimorfismo de *BAX* como de *BCL2* presentaron un efecto principal, el análisis de entropía demuestra que estos SNPs interactúan con el receptor tirosina quinasa (*HER2*) y la integrina (*ITGa6*) para conferir de esta manera, un incremento en el riesgo de desarrollo de la neoplasia mamaria.

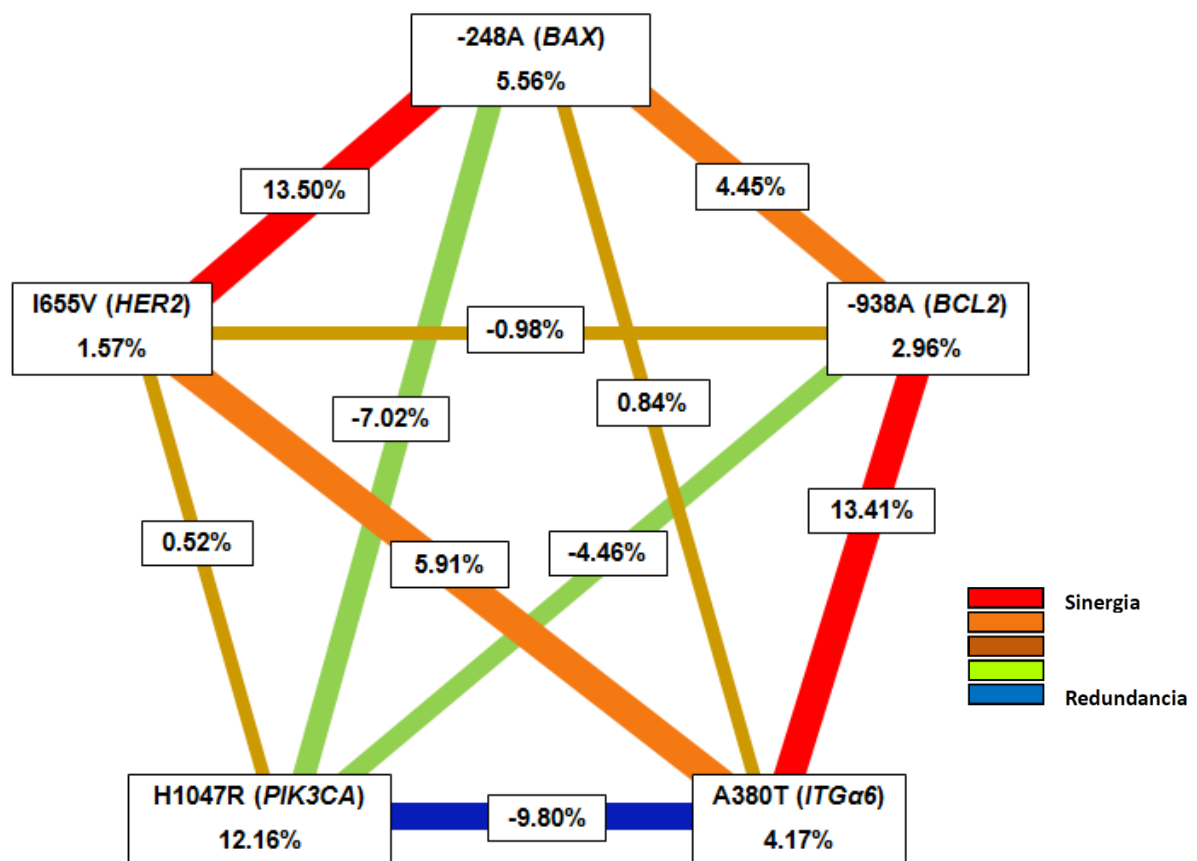


Figura 34. Gráfico de interacción de los SNPs en estudio. Se muestra el porcentaje de entropía que es explicada por cada SNP y por la interacción entre SNPs dentro de la población en estudio. Un porcentaje positivo de entropía indica ganancia de información o sinergia. Sin embargo, un porcentaje negativo indica redundancia o pérdida de información. El esquema de coloración representa un continuo desde la sinergia (rojo, representando una interacción no aditiva), a la redundancia (azul, representando pérdida de información).

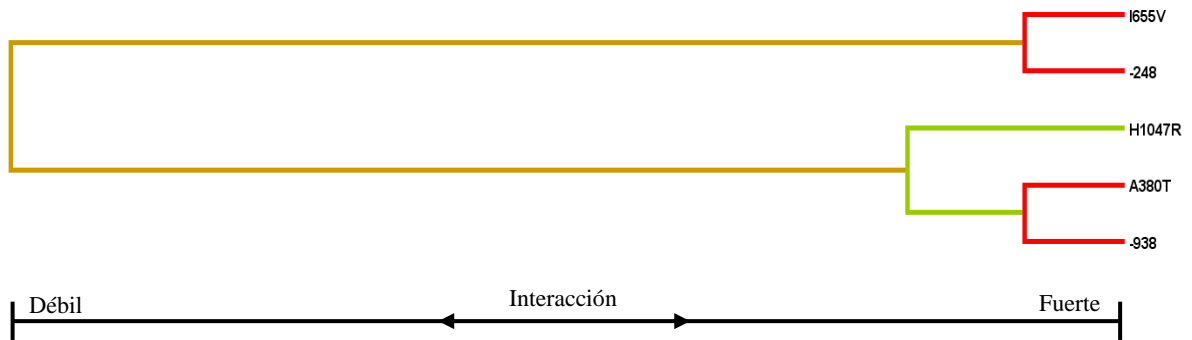


Figura 35. Dendrograma de interacción construido por el MDR. La interacción sinérgica entre los SNPs I655V (*HER2*) y -248A (*BAX*); y A380T (*ITGa6*) y -938A (*BCL2*) está dada por la menor distancia entre ellos. La línea roja sugiere una relación sinérgica (epistasia), la verde redundancia o correlación y la marrón clara independencia entre los atributos.

DISCUSIÓN

5.1. Alteraciones en vías de señalización celular y el cáncer de mama

La forma más común cáncer de mama (esporádico) se debe, sin duda, a múltiples etiologías desconocidas. En contraste con la forma menos común (cáncer de mama familiar), que se atribuye a alteraciones en genes específicos (por ejemplo: *BRCA1* [MIM 113705] y *BRCA2* [MIM 6000185]). Si bien las causas del cáncer de mama esporádico aún permanecen indeterminadas existe evidencia experimental, epidemiológica y clínica que proteínas que regulan la proliferación, motilidad celular y supervivencia están implicadas en el proceso de carcinogénesis (Figura 36) (Eccles, 2001; Guo y Giancotti, 2004; Samuels *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

En relación a proteínas implicadas con la proliferación una de las más estudiadas es HER2 (ErbB2), ya que el 20-30% de los cánceres ductales de mama contiene múltiples copias del gen que lo codifica (Eccles, 2001). Estudios clínicos han demostrado que la alteración de HER2 está asociada a una respuesta reducida a quimioterapia y terapia hormonal, y a un promedio de supervivencia más corta (Ross *et al.*, 2003). Las anormalidades de HER2 se han asociado fuertemente con un pronóstico desfavorable y un comportamiento más agresivo en carcinomas de mama (Paik *et al.*, 2000). El tratamiento con Trastuzumab (Herceptin), un anticuerpo monoclonal humanizado que se une y bloquea el dominio extracelular de HER2 sobreexpresado, en pacientes con cánceres avanzados subraya la importancia de esta proteína y su vía de señalización en la patogénesis del cáncer de mama (Satiroglu-Tufan *et al.*, 2006). La terapia con este anticuerpo ha sido asociada a la mejora de los resultados en pacientes incluyendo la supervivencia (Ross *et al.*, 2003).

Así, el receptor HER2 se ha convertido en un importante blanco en la investigación científica y se lo ha considerado como un factor pronóstico y predictivo en cáncer de mama, siendo clave la evaluación de su sobreexpresión en la decisión del protocolo terapéutico para los pacientes (Pinto *et al.*, 2005). Debido a su importancia, el gen que lo codifica es un importante candidato para el estudio de aquellos polimorfismos que podrían indicar resistencia o susceptibilidad al desarrollo del cáncer de mama (Nelson *et al.*, 2005).

En cuanto a los mecanismos que controlan la invasión tumoral, una lista creciente converge en la integrina $\alpha 6\beta 4$. Esta integrina activa (mediante desmetilación), factores de transcripción y promotores normalmente silenciados que regulan la expresión de genes invasivos y proinvasivos. Hasta la fecha, se identificaron 538 genes que son alterados por esta integrina, de los cuales 36 están asociados con vías de señalización implicadas en la movilidad celular y la metástasis, cuya expresión se correlaciona con la de $\alpha 6\beta 4$ (Chen *et al.*, 2009). Se ha descrito que una alta expresión de $\beta 4$ se relaciona con una resistencia a ciertas drogas antitumorales como el Tamoxifen (Gabarra *et al.*, 2010), y la elevada expresión de $\alpha 6$

se correlaciona con una supervivencia reducida y un fenotipo metastásico en células humanas de cáncer mamario (Bon *et al.*, 2006; Bon *et al.*, 2007).

La integrina $\alpha 6\beta 4$ promueve la invasión tumoral, principalmente a través de una activación de la vía de PI3K que media la transformación de un fenotipo epitelial a uno mesenquimatoso. Esto confiere a la célula motilidad por medio de la formación de filopodios y lamelipodios de F-actina (Bon *et al.*, 2007; Rabinovitz *et al.*, 2001).

Paralelamente, $\alpha 6\beta 4$ puede mediar indirectamente la expresión y activación de los miembros de la familia ErbB, colocándose junto con el receptor en la membrana celular. El receptor ErbB-2 es necesario para la invasión dependiente de PI3K y, al mismo tiempo, $\alpha 6\beta 4$ promueve la traducción de ErbB-3 para que se asocie a ErbB-2 y active PI3K. En muchos casos, la eficacia de la terapia hormonal es anulada por la vía PI3K que permanece muy activa junto con altos niveles de ErbB-2. Esto produce la activación de factores de transcripción que resultan en una disrupción de la polaridad epitelial e hiperproliferación, respectivamente (Bon *et al.*, 2006; Bon *et al.*, 2007).

La proteína AKT ha sido implicada previamente en varios tipos de tumores incluyendo próstata, ovario, tiroides y mama (Zinda *et al.*, 2001; Brazil *et al.*, 2004; Kada *et al.*, 2004). Se ha observado un importante incremento de la actividad kinasa de AKT en aproximadamente el 30-40% de los especímenes de cáncer de mama (Klos *et al.*, 2003; Tokunaga *et al.*, 2006). La importancia clínica de AKT se sustenta en las siguientes observaciones: la activación constitutiva de AKT y otros componentes tanto en carcinomas mamarios *in situ* como invasivos; la activación de AKT confiere resistencia a los anti-estrógenos como Tamoxifeno, una droga terapéutica estándar para carcinomas mamarios con receptor de estrógeno positivo (RE+); y su implicancia en un extenso espectro de resistencias quimio/radio-terapias en cánceres de mama (Liu *et al.*, 2007).

Siendo una de las principales vías de señalización celular, la vía PI3K es una de las más caracterizadas en relación a las propiedades oncogénicas en una variedad de tumores malignos. Particularmente, la tumorigénesis del cáncer de mama dependería fundamentalmente de ésta, ya que en la gran mayoría de los casos de cáncer de mama se presenta al menos un mecanismo molecular que potencialmente potencia la señalización por esta vía. Estos mecanismos incluyen mutaciones en PI3K, más específicamente mutaciones del gen que codifica su subunidad catalítica (*PIK3CA*) (Mukohara, 2015).

Así mismo, es de amplio conocimiento que, en condiciones homeostáticas el equilibrio relativo de expresión y el estado de dimerización entre las moléculas pro y anti-apoptóticas (que están bajo el control de factores como p53) determina la supervivencia o la muerte celular. Por lo tanto, estas proteínas se expresan diferencialmente en situaciones

normales y patológicas, contribuyendo a prevenir o desencadenar la apoptosis a través de vías de señalización celular específicas (Daidone *et al.*, 1999).

Así, muchos estudios realizados en carcinomas de mama, coinciden que la expresión de Bcl-2 generalmente se asocia con la presencia de altos niveles de los receptores de esteroides, baja tasa de proliferación y acumulación débil o ausente de p53 (Silvestrini *et al.*, 1994). También, existe una relación inversa entre la expresión de p53 y Bcl-2; es decir, los tumores con una alta expresión de p53 presentan bajos niveles de Bcl-2 y ausencia de receptores de estrógenos (ER), sugiriendo que las mutaciones en p53 podrían regular la expresión del gen Bcl-2 (Krajewski *et al.*, 1999).

Por otra parte, estudios comparativos de expresión de Bax en epitelio mamario normal y en carcinomas *in situ* revelaron una pérdida de expresión en muestras de carcinomas. Esta pérdida de expresión no se correlaciona significativamente con p53, pero se asoció positivamente con Bcl-2. Además, la expresión reducida de Bax se ha correlacionado una supervivencia global más corta, una rápida progresión al tumor y ausencia de respuesta a la terapia (Krajewski *et al.*, 1995).

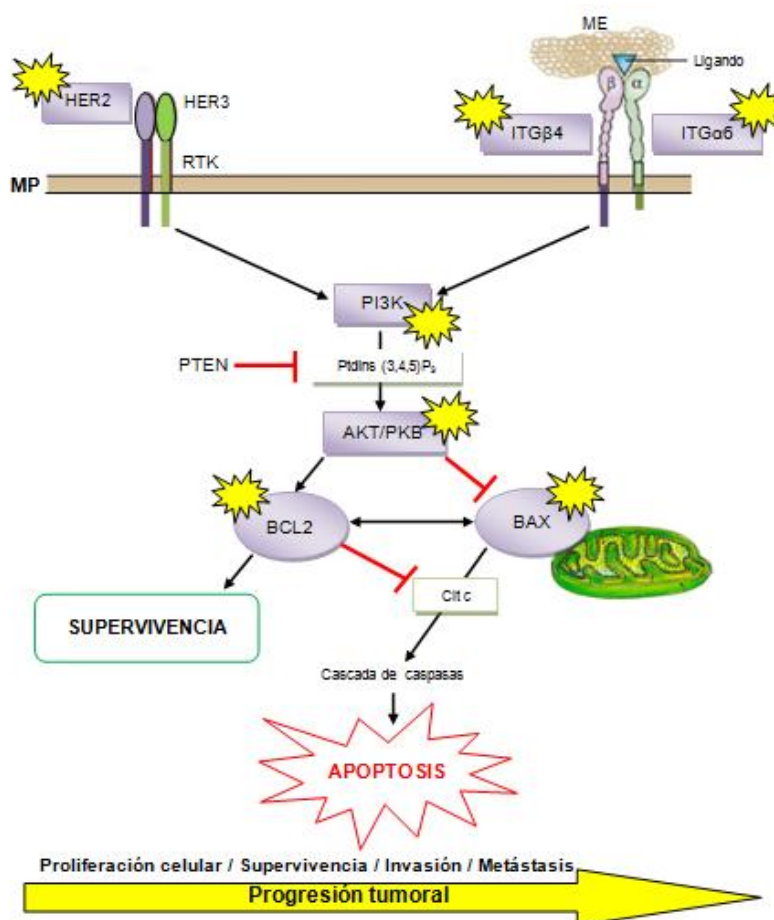


Figura 36: Vía de señalización implicada en la proliferación, adhesión y mecanismos de supervivencia. En el presente trabajo se estudiaron polimorfismos en genes involucrados en esta vía en relación a la carcinogénesis mamaria (asteriscos amarillos). MP: membrana plasmática; ME: matriz extracelular; RTK: receptor tirosina quinasa.

5.2. Polimorfismos De Nucleótido Simple y su relación con el cáncer de mama

En el presente trabajo se evaluó el potencial rol modificador de los polimorfismos genéticos de 7 genes seleccionados de una vía de señalización que podrían afectar la proliferación en el tejido mamario. Del total de polimorfismos analizados en este trabajo, el SNP codificante de *PIK3CA* (H1047R; rs121913279) y los dos SNPs en la regiones 5'-UTR de las regiones promotoras de *BAX* (-248A; rs4645878) y *BCL2* (-398A; rs2279115), serían posibles candidatos de polimorfismos funcionales que afectan la expresión génica y/o la progresión del cáncer de mama en mujeres diagnosticadas de la ciudad de Posadas, Misiones. No se puede excluir la posibilidad que estos SNPs tengan un efecto diferencial en otro grupo étnico debido a interacciones gen-gen y gen-ambiente o que la predisposición de presentar un SNP sea exclusivo de otra población. La asociación detectada podría poner de manifiesto su utilidad como potenciales biomarcadores de susceptibilidad.

5.2.1. Polimorfismos I655V y W452C de *HER2*.

El gen *HER2* juega un rol crucial en el cáncer, se sobreexpresa en un 20-30% de los cánceres de mama, resultando en una activación y un crecimiento más agresivo, sumado a una reducción en la respuesta a quimioterapia y terapia hormonal, así como un pronóstico desfavorable (Slamón *et al.*, 1987; Berchuck *et al.* 1990).

El rol crítico que juega el dominio transmembrana en la función de *HER2* hace del polimorfismo I655V un importante candidato como factor de susceptibilidad en cáncer de mama (Akasik y Dalay, 2004; Naidu *et al.*, 2008).

El polimorfismo I655V está ubicado sobre el exón 17 del gen *HER2* e involucra la transición de ATC a GTC, que resulta en un cambio de isoleucina (Ile) a valina (Val) en el dominio transmembrana del receptor. Experimentos realizados *in vitro* en ratones inyectados con Trastuzumab, demostraron que la isoforma *HER2*/I655Val sería más sensible al anticuerpo, detectado por una fosforilación reducida y una disminución en el crecimiento de las células que expresan la isoforma Val en comparación con la isoforma Ile. Aún así, es poco probable que la variabilidad en un solo receptor tirosina quinasa activo sea responsable de la diferencia en la eficacia antitumoral del anticuerpo. La variabilidad antitumoral en el tratamiento con Trastuzumab podría estar relacionado con otros cambios en la vía de señalización, tal como la pérdida de PTEN (Beauclair *et al.*, 2007).

Muchos estudios sugieren que el genotipo homocigota GG (Val/Val) codifica receptores con alta capacidad de dimerización y posible activación constitutiva, lo cual consecuentemente activa con más poder las vías de señales intracelulares tales como MAPK

y PI3K/AKT, conduciendo a la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Pinto *et al.*, 2005).

En base a un análisis computacional, se ha reportado que la región transmembrana del homodímero de HER2 puede existir en dos conformaciones estables, tanto en forma activa como inactiva (modelo de “switch” molecular). Los autores mostraron que la sustitución de Val por Ile en esta posición podría desestabilizar la formación de dímeros activos de HER2. Esto resulta en una actividad tirosina quinasa disminuida, aún durante la sobreexpresión de receptores de HER2. Sin embargo, la presencia del alelo variante Val se ha asociado con la formación de dímeros activos del dominio transmembrana que resulta en un incremento de autofosforilación, activación tirosina quinasa y transformación celular (Fleishman *et al.*, 2002).

La asociación de este polimorfismo con el cáncer de mama ha sido sugerido como un importante biomarcador de susceptibilidad, particularmente entre mujeres chinas jóvenes \leq 45 años (Xie *et al.*, 2000). Resultados similares fueron obtenidos en pacientes taiwanesas y japonesas (Lee *et al.*, 2008; Hishida *et al.*, 2002). Por otra parte, estudios realizados en carcinomas gástricos en pacientes turcos, han mostrado que el genotipo heterocigota Ile/Val representa el 20% de los casos ($p=0,04$), y este genotipo se asocia con el estadio IV (Satiroglu-Tufan *et al.*, 2006). Así mismo, se ha encontrado asociación con el carcinoma uterino cervical avanzado en una cohorte polaca y en pacientes con cáncer de ovario, en las cuales se ha observado que las portadoras del genotipo homocigota Val/Val presentan un menor promedio de supervivencia (Kruszyna *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2005).

Sin embargo, los resultados del presente trabajo no aportan evidencia para esta asociación, indicando que el polimorfismo I655V no jugaría un rol importante en la susceptibilidad de desarrollar el cáncer de mama en mujeres de Posadas, Misiones.

En este estudio, la frecuencia de la variante 655Val (G) en el gen *HER2* en ambos grupos, casos y controles, alcanzó valores de 25% y 20%, respectivamente. El análisis de asociación fue estimado según el modelo dominante y demostró que no existe asociación entre el SNP I655V con la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama (OR= 1,58; 95%CI=0,88-2,81; $p=0,1402$).

Así mismo el análisis estratificado por las variables clínico-patológicas del grupo de casos ratificó que no existe asociación entre los genotipos variantes (AG y GG) con el riesgo de cáncer de mama, no evidenciándose diferencias entre los riesgos estimados entre los estratos.

Los resultados obtenidos en este trabajo no respaldan una asociación y coinciden con otros realizados en cáncer de mama en mujeres británicas (Baxter y Campbell, 2001;

Benusiglio *et al.*, 2005), turcas (Akasik y Dalay, 2004), alemanas (Frank *et al.*, 2005), estadounidenses (Nelson *et al.*, 2005), coreanas (Han *et al.*, 2005) y malayas (Naidu *et al.*, 2008). Así mismo, estudios realizados en cáncer colorectal (McKay *et al.*, 2002) y pulmón (Jo *et al.*, 2008) han sido coincidentes.

El polimorfismo I655V ha sido estudiado en diferentes grupos étnicos (Ameyaw *et al.*, 2000, 2002; Keshava *et al.*, 2001) y se ha informado que el alelo Val se observa con mayor frecuencia en individuos caucásicos y americanos-africanos (Wang-Gohrke y Claude, 2001). Además, otros estudios sugieren que este genotipo podría ser menos común en descendientes africanos y asiáticos (Lee *et al.*, 2008).

La variante I654Val está ligada a la variante más frecuente I655Val y ambos residuos están altamente conservados entre las especies (Frank *et al.*, 2005). Varios estudios han informado que el cambio de dos isoleucinas consecutivas por dos valinas, como resultado de la presencia del SNP vecino I654Val en el dominio transmembrana podría tener un efecto aun más fuerte en la formación de dímeros activos (Frank *et al.*, 2005; Kruszyna *et al.*, 2010), ya que los cambios de isoleucina por valina afectan la estabilización de los dominios proteicos hidrofóbicos, tale como los dominios transmembrana, afectando su hidrofobicidad (Takano *et al.*, 1995).

De esta manera, las diferencias étnicas en la asociación del SNP I655V con el riesgo de cáncer de mama podrían ser explicadas por el ligamiento entre Val654-Val655, y las desviaciones en el riesgo del SNP I655V podría deberse a las diferencias en las proporciones de Val654/Val655 en grupos étnicos (Frank *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la discrepancia entre los resultados podría deberse a la estratificación de la población o la significativa variación en la penetrancia del alelo Val en grupos étnicos (Ameyaw *et al.*, 2000; Ameyaw *et al.*, 2002). Sin embargo, los datos de muchos estudios publicados no son comparables debido a que algunos han evaluado separadamente los genotipos heterocigotas (Ile/Val) y los homocigotas (Val/Val) mientras que otros han combinado ambos genotipos, lo cual podría alterar la significancia de la asociación con el riesgo de cáncer de mama (Naidu *et al.*, 2008).

Por otra parte, un estudio *in silico* realizado por Rajasekaran y colaboradores (2008) mostró que el SNP W542C de *HER2* que provoca la sustitución de un aminoácido aromático (triptófano, Trp) por uno polar (cisteína, Cys) resulta en una proteína menos estable en comparación con la nativa, además presenta un índice de tolerancia de sustitución menor a 0,05 que indicaría un mayor impacto deletéreo con un alto nivel de alteración estructural. Sin embargo, la presencia de este SNP provocaría un desplazamiento del eje proteico que permitiría una mejor interacción con el anticuerpo Herceptin mediante la formación de

puentes de hidrógeno adicionales, lo que a su vez mejoraría la acción del anticuerpo (Rajasekaran *et al.*, 2008). Por lo tanto, este estudio propone al SNP W452C como candidato para estudios clínicos y experimentales adicionales.

Sin embargo, en el presente trabajo no se identificaron individuos portadores del SNP W542C de *HER2*. Estos resultados son coincidentes con otros trabajos realizados en cáncer de mama (Breyer *et al.*, 2009).

5.2.2. Polimorfismo A380T de *ITGa6* y la mutación R1281W de *ITGβ4*.

La variante A380T es un polimorfismo ubicado sobre el exón 7 del gen *ITGa6* y produce un cambio en la región intracelular de $\alpha 6$ del aminoácido pequeño y no polar alanina (Ala) por otro pequeño pero polar, treonina (Thr). A nivel estructural de la proteína, el reducido tamaño de ambos aminoácidos podría no acarrear modificaciones significativas a diferencia de los inconvenientes respecto a la carga, donde las interacciones hidrofóbicas normales podrían verse afectadas por la presencia de los grupos polares del nuevo residuo. De la misma manera, sería posible una alteración en las relaciones de $\alpha 6$ con la subunidad $\beta 4$ de la integrina.

En nuestro estudio, la frecuencia de la variante 380Thr (A) en el gen *ITGa6* fue similar en ambos grupos casos y controles, alcanzando valores de 32% y 34%, respectivamente.

El análisis de asociación reflejó que no existe asociación entre la variante A380T (G>A) y la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama (OR= 0,92; 95%CI= 0,52-1,63; p=0,884). Tanto el modelo dominante como los restantes fueron coincidentes y arrojaron valores cercanos al valor nulo de asociación (OR=1), ratificando la falta de asociación. Así mismo el análisis estratificado por las variables clínico-patológicas del grupo de casos indicó que no existe asociación entre los genotipos variantes (GA y AA) de A380T en el gen *ITGA6* con el riesgo de cáncer de mama, no evidenciándose diferencias entre los riesgos estimados entre los estratos. No obstante, sería conveniente evaluar si esta relación se modifica al incrementar el número de casos y controles analizados.

Por otra parte, la mutación R1281W situado en el exón 31 del gen de *ITGβ4* implica un reemplazo del aminoácido con carga positiva arginina (Arg) por otro aromático o no polar, triptófano (Trp). Ambos aminoácidos son de tamaño considerable y el cambio podría implicar alteraciones en las interacciones polares normales por la incursión del grupo aromático del nuevo residuo. Al mismo tiempo y por su ubicación en la integrina $\beta 4$ (dominio FNIII-2), este cambio aminoácido podría estar modificando la interacción con la plectina, desestabilizando la integridad del hemidesmosoma y propiciando la migración celular, requisito para el desarrollo metastásico (Mercurio *et al.*, 2001; Koster *et al.*, 2001;

Pereda *et al.*, 2009). Si bien, esta mutación ha sido vinculada a las formas no letales de epidermolisis bullosa (Pulkkinen *et al.*, 1998), al momento no existen registros de estudios realizados en otras patologías, constituyendo el presente trabajo el primer antecedente en cáncer. En este estudio la frecuencia de la mutación R1281W resultó nula tanto en el grupo de casos (carcinoma mamario) como de controles.

5.2.3. Mutaciones hotspots en los exones 9 y 20 de *PIK3CA*.

A pesar de que cada tumor humano tiene una constitución genética única, ciertos oncogenes se encuentran mutados frecuentemente en las mismas posiciones (Gabelli *et al.*, 2010). Dichas mutaciones *hotspot* pueden caracterizar a un subtipo particular de cáncer, conferir resistencia o sensibilidad a inhibidores individuales y en algunos casos, correlacionarse con el pronóstico de dicha enfermedad (Gabelli *et al.*, 2010).

Los residuos Glu542 y Glu545 en el dominio helicoidal de *PIK3CA* están frecuentemente mutados por lisina en cáncer, los cuales conllevan a una reversión de cargas en dichas posiciones, de glutamato (E) con carga negativa a lisina (K) con carga positiva (Huang *et al.*, 2007). Éstas se presentan en la interfase entre los dominios helicoidal (p110) y nSH2 (p85), provocando una alteración parcial en la interacción de estos dominios que conlleva a una reducción en el efecto inhibitorio que ejerce nSH2 sobre el dominio quinasa (p110). Esto podría explicar el aumento de la actividad enzimática en presencia de estas mutaciones (Huang *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, la frecuencia alélica de la variante mutada lisina (K) fue muy similar para ambas mutaciones; con un valor del 5% (casos y controles) para E542K; 6% y 7% para E545K en casos y controles, respectivamente.

En ambos casos solamente se identificaron individuos heteocigotas portadores de la variante (GA), por lo que el riesgo (OR) fue estimado siguiendo el modelo codominante. De este modo, se ha observado que la presencia de una sola copia del alelo variante A no se asocia al riesgo de cáncer de mama, con un OR= 0,96; 95%CI= 0,37-2,47; p=1,000 para la mutación E542K (G>A) y OR= 0,83; 95%CI= 0,33-2,07; p=0,8204 para la E545K (G>A). El análisis estratificado por las variables clínico-patológicas del grupo de casos ratificó la falta de asociación.

Las mutaciones en el exón 9 han sido observadas en varios tipos de cánceres, como mama, colon, cerebro, gástrico y pulmón, en un 47% aproximadamente (Samuels *et al.*, 2004). Estudios previos han descrito que estas mutaciones podrían producir una interferencia en la unión de los dominios helicoidal y quinasa, lo que disminuiría el efecto inhibitorio de p85 sobre la actividad quinasa (Huang *et al.*, 2007; Mandelker *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el estudio de la mutación H1047R en el exón 20 de *PIK3CA* que lleva a la sustitución de histidina (His) por arginina (Arg) dentro del dominio quinasa, la frecuencia alélica de la variante mutada Arg presentó discrepancias entre el grupo de casos (7%) y controles (0,4%).

Las mutaciones en el exón 20 han sido observadas con una prevalencia mayor al 30% en cánceres de mama, colon, cerebro, gástrico y pulmón (Samuels *et al.*, 2004). Generalmente, se considera que las mutaciones oncogénicas en los dominios catalíticos de las enzimas quinasas como es el caso de H1047R, aumentan su actividad al afectar la conformación del bucle de activación (Huang *et al.*, 2008). Sin embargo, otros autores sugieren que estas mutaciones generan cambios en la orientación de ciertos residuos en el dominio quinasa que producen un mayor contacto con la membrana plasmática y por ende permiten una mayor accesibilidad de la enzima a los sustratos PIP₂ que se encuentran anclados en la misma, iniciando la cascada de señalización que lleva a la oncogénesis (Mandelker *et al.*, 2009).

Al igual que en el estudio de las mutaciones del exón 9, para la mutación H1047R del exón 20 de *PIK3CA* solamente se detectaron representantes heterocigotas de la variante (AG) por lo que el riesgo fue estimado siguiendo el modelo codominante. Sin embargo, en este caso se ha observado que una sola copia de la variante G es suficiente para aumentar hasta 20 veces el riesgo de susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama (OR=21,14; 95%IC=2,67-167,4; p=0,0001). El análisis estratificado por las variables clínico-patológicas del grupo de casos ratificó que existe una fuerte asociación entre el genotipo AG con el riesgo de cáncer de mama, salvo para los pacientes con invasión linfovascular negativa en los que la asociación no fue significativa.

En el estudio de esta mutación se detectó la presencia de otro cambio (C>T) (H1047L) descrito en las bases de datos de SNPs del NCBI (dbSNP) y que provoca el cambio de histidina (His) por el residuo leucina (Leu) en la misma posición. La frecuencia del alelo Leu en el grupo de casos fue del 2% y nula en el grupo de controles; razón por la cual no se pudo realizar el estudio de asociación. Sin embargo, el riesgo asociado a la presencia de cualquiera de las dos variantes Arg ó Leu (G ó T) en la posición 1047 en individuos con cáncer de mama se incrementa hasta 25 veces (OR=24,98; 95%IC=3,19-195,3; p<0,0001).

Así mismo, el análisis de haplotipos mostró que los individuos que heredan los haplotipos (GGG y GGK) portadores de las variantes G y K en la posición 1047, presentan entre 17-18 veces más probabilidad de desarrollar cáncer de mama que aquellos que no lo presentan, ratificando el riesgo observado en el análisis de los genotipos por separado.

La localización de mutaciones *hotspot* en las interfaces de los distintos dominios de PI3K que han sido asociadas al cáncer, apuntan a la posibilidad de desarrollo de nuevos

inhibidores para el sitio de unión al ATP y otros compuestos que interrumpen la interacción entre los dominios, lo que reduciría la posibilidad de interferir con la actividad de otras quinasas/ATPasas (Huang *et al.*, 2008). Puntualmente, se ha demostrado que los diferentes subtipos de cáncer de mama, determinados por las variables de los receptores de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), de estrógeno (ER) y de progesterona (PR), presentan mutaciones *hotspot* de *PIK3CA* específicas, por lo que actuarían como posibles marcadores moleculares para ayudar a predecir la evolución de la enfermedad y la sensibilidad al tratamiento (Adams *et al.*, 2011).

5.2.4. Mutación E17K del gen *AKT1*

La mutación E17K afecta el bolsillo de unión lipídica del dominio PH de AKT. La lisina (Lys) en la posición 17 altera las interacciones electrostáticas del bolsillo y forma nuevos puentes de hidrógeno con un ligando fosfoinositol (Carpten *et al.*, 2007).

Así, la transformación constitutiva de AKT se atribuye al cambio estructural en la conformación del dominio PH debido a la sustitución de un residuo ácido (glutamato, Glu) por uno básico (lisina, Lys), resultando en un incremento en la tasa de reclutamiento hacia la membrana plasmática (Malanga *et al.*, 2008). Esta localización patológica en la membrana plasmática, provoca la activación de AKT1 y estimula la señalización corriente abajo, transformando las células e induciendo leucemia en ratones (Carpten *et al.*, 2007).

Además, se ha descrito que la actividad kinasa endógena de AKT portadora de la mutación E17K es más elevada en tejido tumoral que en tejido *wild type*. Estos resultados evidencian un incremento de los niveles de fosforilación de los sustratos corriente abajo y por lo tanto, la capacidad de AKT1 de activar selectivamente vías de señalización específicas mientras que la vía dependiente de MAP kinasas no es afectada (Malanga *et al.*, 2008). Esta mutación se presenta en baja frecuencia de cánceres de mama, ovario y colorectal (Carpten *et al.*, 2007).

En este trabajo, el cambio de G>A en el codón 17 del exón 3 de *AKT* que resulta en un cambio de residuo Glu a Lys (E17K) también resultó poco frecuente y sólo se ha observado un solo caso heterocigota variante (1%). Estos resultados son coincidentes con otros trabajos realizados en cáncer de mama donde la frecuencia de la mutación representó un 4,3% (4/93), y en cáncer de pulmón donde fue detectada en un 1,9% (2/205), representando el 5,5% (2/36) de los histotipos escamosos del carcinoma (Kim *et al.*, 2008; Malanga *et al.*, 2008). En otros trabajos realizados en carcinoma colorectal, de pulmón, gástrico y hepatocelular (Kim *et al.*, 2008), leucemia mieloide y glioblastomas (Tibes *et al.*, 2008, Mahmoud *et al.*, 2008) y meduloblastomas (Schuller *et al.*, 2008), la frecuencia de la mutación E17K fue nula.

Debido a que en el grupo de controles en estudio no se ha detectado la mutación no se realizó el estudio de asociación con la enfermedad. Así mismo, no se detectó la delección del nucleótido G (delG) que provoca un cambio de lectura en la misma posición (E17Sfs).

La falta de representantes portadores de la variante E17K tanto en el grupo de casos como en controles tampoco permitió el análisis por estratificación por variables clínico-patológicas.

La vía de señalización de PI3K es una de las más afectadas por aberraciones genéticas en distintos tipos de cánceres. Debido a esto, muchas compañías se esfuerzan por desarrollar drogas dirigidas contra los componentes de la vía (Hennessy *et al.*, 2005). Ciertas mutaciones tumor-específicas podrían determinar la eficacia de una droga dirigida a un componente particular de la vía de PI3K. La terapia dirigida a una molécula corriente arriba en la vía podría limitar la eficacia antitumoral en pacientes con mutaciones activantes corriente abajo. Como la activación de AKT1-E17K depende de la fosforilación por PDK1 y PDK2 (Carpten *et al.*, 2007), las células que llevan esta mutación podrían ser sensibles a inhibidores tanto corriente arriba como abajo. Sin embargo, como AKT1-E17K está asociado a la membrana en ausencia de actividad PI3K, los tumores con esta mutación podrían no responder a la terapia (Brugge *et al.*, 2007).

5.2.5. Polimorfismos en los promotores de *Bax* y *Bcl2*.

Debido a la importancia de la familia BCL-2 en los mecanismos de supervivencia y muerte celular, la presencia de variantes genéticas que alteren la expresión normal de genes implicados en estos procesos como *Bax* y *Bcl2*, contribuirían al desarrollo de carcinomas.

En el presente trabajo, la frecuencia alélica del SNP -248 G>A de *Bax* presentó diferencias entre el grupo de casos (34%) y controles (51%). Las frecuencias genotípicas mostraron una marcada mayoría de genotipos heterocigotas (GA), similares a otros trabajos publicados en cáncer de mama (Kholoussi *et al.*, 2014). En contraposición estudios realizados en leucemia mostraron que la frecuencia del genotipo normal está presente mayoritariamente (Chen *et al.*, 2007; Starczynski *et al.*, 2005).

El análisis de asociación mostró que los individuos portadores de 2 copias del alelo variante (homocigotas variante AA) presentan una probabilidad 20% menor de desarrollar cáncer de mama (OR=0,2; 95%IC=0,08-0,51; p=0,0002) a diferencia de los heterocigotas que portan una sola copia (GA). De modo que este SNP podría actuar como un biomarcador de protección en cáncer de mama.

Estos resultados son coincidentes con estudios reportados en leucemia linfocítica crónica y cáncer de pulmón (Saxena *et al.*, 2002; Moshynska *et al.*, 2005; Kuznetsova *et al.*,

2012), mientras otros mostraron falta de asociación (Starczynski *et al.*, 2005; Nuckel *et al.*, 2006; Skogsberg *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Yildiz *et al.*, 2013).

El OR ajustado por las variables clínico-patológicas mostró que no hay diferencias significativas entre los estratos, ratificando así la asociación entre el genotipo homocigota (AA) con una menor susceptibilidad de desarrollar cáncer de mama. Además, este efecto protector sería más evidente en mujeres con presentan invasión linfovascular positiva; receptores de progesterona y estrógeno positivos; receptor HER2 negativo y grado histológico II.

En el análisis del SNP -938 C>A de *Bcl-2* la frecuencia alélica entre casos y controles fue de 49% y 37%, en casos y controles respectivamente. Al igual que en el caso anterior, la frecuencia observada de genotipos heterocigotas (CA) fue elevada tanto en casos (55%) como controles (41%). Resultados similares fueron obtenidos en cáncer de mama y orofaríngeo (Bachman *et al.*, 2007; Lehnerdt *et al.*, 2009; Alshatwi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

El análisis de asociación mostró que la presencia del SNP -398A aumenta en un 70% el riesgo de susceptibilidad de desarrollar cáncer de mama respecto de aquellos individuos que no lo presentan (OR=1,69; 95% IC=1,13-2,54; p=0,0134). Además, el riesgo aumenta de acuerdo al número de copias del alelo A, de manera que los homocigotas (AA) tienen más riesgo que los heterocigotas (CA).

Respaldan nuestros resultados estudios realizados en cáncer de cabeza y cuello (Chen *et al.*, 2007) y cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2011) que sugieren que la presencia del SNP de *Bcl-2* es un factor de riesgo.

Los riesgos estimados entre los estratos mostraron diferencias, con un riesgo aumentado de hasta 3 veces en mujeres menores a 55 años, invasión linfovascular positivo, grado histológico II y periodo menopáusico sin distinción (pre y post-menopáusico); y hasta 6 veces para las que presentan receptor de HER2 negativo.

Si bien en este trabajo no se realizaron estudios de expresión, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede inferir que el SNP -248A de *Bax* podría estar asociado a un aumento de su expresión, ya que *Bax* impediría el crecimiento descontrolado de las células tumorales promoviendo la apoptosis y actuando de manera protectora.

Sin embargo, estudios realizados en leucemia demostraron que la expresión de *Bax* es significativamente más baja en aquellos pacientes portadores del SNP -248 G>A (GA y AA) y esto se asocia a un estadio avanzado de la enfermedad y una respuesta incompleta al tratamiento (Kholoussi *et al.*, 2014; Starczynski *et al.*, 2005; Saxena *et al.*, 2002). Así mismo, la baja expresión de la proteína *Bax* en carcinomas cervicales, ováricos y uterinos, y la

reducción del ARNm en carcinomas metastásicos mamarios se asocian con una pobre respuesta a la quimioterapia y una menor supervivencia (Moshynska *et al.*, 2005).

En consecuencia, podríamos inferir que la presencia del SNP -938A de Bcl2 se asocia a una elevada expresión de la proteína ya que por su función antiapoptótica favorecería el crecimiento de las células tumorales, actuando como factor de riesgo. Así, estudios realizados en leucemia sugirieron que el genotipo homocigota AA del SNP -938 C>A de Bcl-2 se asocia a niveles altos de expresión de la proteína y a un mal pronóstico (Bachman *et al.*, 2007). Sin embargo, otros realizados en cáncer de mama han mostrado que el incremento en la expresión de la proteína Bcl-2 está asociado con un pronóstico favorable (Zhang *et al.*, 2011; Lehnerdt *et al.*, 2008). Además, la presencia de Bcl-2 en tumores de mama, se ha correlacionado con positividad de receptores (HER2, PR y ER) y larga sobrevida libre de enfermedad (Secretaría de Salud México, 2002).

Por lo tanto, sería conveniente analizar la expresión de los genes *Bax* y *Bcl2* asociado a la presencia de estos polimorfismos en las muestras en estudio con el fin de evaluar y comprender su real contribución como marcadores biomarcadores en cáncer de mama.

5.3. Diferencias entre los estudios de asociación

Existen numerosos trabajos que han encontrado verdaderas asociaciones de estas variantes genéticas con el cáncer de mama, sin embargo también han sido identificadas varias asociaciones falso-positivas, las cuales no han podido ser replicadas en otras poblaciones. Las discrepancias observadas en los diferentes estudios pueden haber surgido por varias razones (Barbisan, 2014).

En primer lugar, una fuente de sesgo particularmente reconocida en los análisis de asociación genética es el error en la genotipificación, el cual puede originarse como consecuencia de la variación en la sensibilidad de los métodos utilizados (Barbisan, 2014). Cabe destacar que, en estudios de este tipo, la exactitud y solidez de los ensayos para genotipificación de SNPs son de suma importancia, para generar resultados estadísticamente significativos y confiables.

La metodología de genotipificación utilizada en este trabajo fue el de PCR-RFLP, la cual ha demostrado ser altamente analítica, específica y sensible, y por lo tanto factible de ser utilizada de forma fiable para diagnóstico (Xu *et al.*, 2003). Asimismo, con el fin de comprobar la fidelidad de los resultados obtenidos por esta técnica, se eligieron al azar 10 representantes del total de las muestras genotipificadas mediante PCR-RFLP para cada SNP, para ser secuenciadas y confirmar de esta manera el genotipo asignado.

Por otra parte, para aquellos marcadores en los que no fue posible su genotipificación mediante PCR-RFLP, se utilizó la técnica basada en la secuenciación del ADN. Esta tecnología es considerada actualmente como la técnica de referencia (*gold standard*) para la genotipificación de SNPs. Tiene la ventaja de que cualquier posición variable puede ser investigada directamente, permitiendo el análisis de un polimorfismo específico así como posiciones nucleotídicas adyacentes (Nilsson y Johansson, 2004; Ahmadian *et al.*, 2000). La solidez (robustez) de esta técnica en el proceso de secuenciación garantiza la ausencia o al menos una alta reducción de errores en la genotipificación.

Otro factor de sesgo importante es la desviación del Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) de las frecuencias genotípicas en los controles. En el presente trabajo, el grupo control cumplió con los criterios del equilibrio de HW para todos los polimorfismos analizados, siendo éste un requisito fundamental para el desarrollo de cualquier análisis de asociación. Si la población no se encuentra en EHW, los resultados deben tratarse con precaución porque la distribución genotípica observada en el grupo control no sería representativa de la población de la cual se tomaron los casos, y por lo tanto las conclusiones tendrían un valor limitado (Györfy *et al.*, 2004; Esser y Tomluk, 2005). En cambio, en la muestra de casos puede ocurrir que no se cumpla el EHW, siendo esto un posible indicativo de que el polimorfismo esté asociado con la enfermedad (Iniesta *et al.*, 2005). Lógicamente, para aquellos polimorfismos en los que no se identificaron representantes en el grupo de controles (como *AKT1*) no fue posible el análisis de asociación.

La desviación del EHW, muchas veces es consecuencia de errores metodológicos o de muestreo. Sin embargo, también debe considerarse la posibilidad de que fuerzas evolutivas, como la selección o la migración, estén actuando sobre la población en estudio, o bien, esta desviación podría implicar una mezcla de etnias en la población estudiada, si el sitio polimórfico analizado varía de acuerdo a la raza o etnia (Schaid *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2001). Por lo tanto, sería inapropiado utilizar poblaciones cuyos controles se aparten del equilibrio, ya que los resultados obtenidos serían cuestionables (Barbisan, 2014).

Otra fuente de variación que debe ser considerada es el tamaño muestral. La credibilidad de un estudio se ve reforzada cuando existe gran cantidad de datos o evidencia consistente. Un gran número de datos es necesario para asegurar una potencia adecuada que permita detectar una asociación (si está presente), y alcanzar niveles más estrictos de significancia estadística, o bien tasas de falsos-positivos más bajas (Benjamini *et al.*, 1995). Tamaños muestrales grandes tienden también a disminuir la incertidumbre en la magnitud del efecto genético observado (Balding, 2006). Los estudios más grandes tienden a estar menos afectados por los sesgos que aquellos estudios más pequeños, aunque esto no siempre

está garantizado (Ioannidis *et al.*, 2003). La cantidad efectiva de datos o evidencia necesaria depende de los factores que influyen en la potencia del estudio para detectar una asociación verdadera, es decir, el tamaño total de la muestra, el modelo genético subyacente a la asociación, la frecuencia de la variante genética de interés y la magnitud de la asociación (Barbisan, 2014).

Por lo tanto, la falta de réplica o la heterogeneidad entre estudios pueden ser una señal de errores y sesgos subyacentes, como ser errores de genotipificación, clasificación errónea de fenotipos, estratificación de la población y sesgo en la notificación de resultados (Balding, 2006; Pompanon *et al.*, 2005; Clayton *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2003). Sin embargo, en varias ocasiones la falta de réplica en una nueva población no refuta necesariamente la asociación reportada originalmente. Esto puede estar reflejando diferentes patrones de desequilibrio de ligamiento a través de distintas poblaciones, o puede estar demostrando la existencia de una interacción génica particular de la población, o inclusive puede deberse a la presencia de interacciones genes-ambiente (Hunter, 2005; Evans *et al.*, 2006). Por lo tanto, muchas veces la heterogeneidad encontrada en diferentes estudios puede indicar una diversidad genuina en el efecto genético de la variante estudiada (Barbisan, 2014).

5.4. Interacciones génicas en el cáncer de mama

Como se mencionó previamente, muchos son los estudios epidemiológicos (incluyendo el presente trabajo) los que han evaluado el riesgo de desarrollar cáncer de mama asociado a genotipos individuales de determinados genes. Sin embargo, las enfermedades complejas, como el cáncer de mama, son el resultado del efecto sinérgico de numerosas variantes génicas de susceptibilidad, junto a la interacción con factores ambientales. Por lo tanto, estas interacciones génicas podrían explicar diferencias en la susceptibilidad del cáncer de mama.

De esta manera, la interacción entre genes de penetrancia incompleta, particularmente aquellos de baja penetrancia, juega un rol importante en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades, como el cáncer. Aunque el riesgo asociado con cada alelo individual pueda ser pequeño, el efecto aditivo o sinérgico que puede aportar la combinación de un cierto número de variantes alélicas puede presentar una mayor contribución al desarrollo del fenotipo, que aquellos genes de alta penetrancia. Por este motivo, es el efecto acumulativo de los polimorfismos presentes en genes de baja penetrancia el que juega un rol crítico en la predisposición individual al desarrollo de enfermedades como el cáncer, más que el efecto independiente de cualquier gen de susceptibilidad (Moore, 2003; Houlston y Peto, 2004).

Por lo tanto, en el presente trabajo, luego de analizar el efecto individual de los SNPs con respecto al riesgo de desarrollo de la enfermedad, se evaluaron las interacciones génicas aditivas o sinérgicas que contribuirían al riesgo de desarrollar cáncer de mama. Con este propósito, se realizó un análisis con el algoritmo computacional MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*), ya que los enfoques mediante análisis de regresión logística para el estudio de enfermedades complejas con un *background* poligénico si bien son informativos, pueden subestimar la contribución genética a la enfermedad en presencia de interacciones entre loci (Ritchie *et al.*, 2001; Beretta *et al.*, 2008). Esto se vio reflejado en los resultados obtenidos.

Del análisis del conjunto de polimorfismos estudiados en este trabajo se han identificado interacciones estadísticamente significativas entre 4 SNPs presentes en genes implicados en la proliferación y adhesión (*HER2* y *ITGa6*); y la vía apoptótica (*BAX* y *BCL2*). Dicha interacción aumentaría la susceptibilidad de desarrollar cáncer de mama, en los individuos portadores de los genotipos de alto riesgo. De éstos, 2 SNPs (-248G>A de *BAX* y -938C>A de *BCL2*) presentaron un efecto individual y opuesto sobre la susceptibilidad de desarrollo de cáncer de mama.

Por lo tanto, según el diagrama de interacción, el riesgo asociado a estas combinaciones sería resultado de la acción sinérgica de las variantes alélicas presentes en dichos genes. Estas interacciones son indicativas de genes de vías de señalización que actúan secuencialmente, donde los genes ubicados corriente arriba de la vía son epistáticos sobre los más “bajos” y sugieren un intercambio biológico de información (*cross-talk*) entre genes implicados en la proliferación, adhesión celular y la vía apoptótica.

Por lo tanto, la presencia de interacciones epistáticas entre los diferentes SNPs podría explicar los resultados aparentemente contradictorios observados en el análisis de asociación de los SNPs por separado y los obtenidos por el MDR. Si bien, los análisis de asociación mediante métodos de regresión logística en presencia de modelos dominante, recesivo y aditivo son muy informativos frente a otros enfoques, tanto paramétricos como no paramétricos, no permiten detectar interacciones cuando se involucran genes con poco o ningún efecto marginal (Beretta *et al.*, 2008).

Actualmente, se observa un creciente número de trabajos en los cuales se evalúa el efecto conjunto de los SNPs en la susceptibilidad al desarrollo de distintas enfermedades y diversos tipos de cáncer, como de cabeza y cuello (Choudhury y Ghosh, 2014; Santiago *et al.*, 2014), cáncer gástrico (Gonzalez-Hormazabal *et al.*, 2014), colorectal (Yu *et al.*, 2014), cervical (Barbisan *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013) y cáncer de mama (Tulsyan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). En este sentido, la elucidación de cómo los alelos de susceptibilidad interactúan entre

ellos y con los factores ambientales y de estilo de vida será un desafío clave en el futuro para la genética epidemiológica y molecular de la predisposición al cáncer (Barbisan, 2014).

5.5. Importancia de los estudios de asociación y perspectivas futuras

Actualmente, existe un gran interés en los estudios de asociación entre los SNPs y diferentes patologías, entre ellas el cáncer. Los SNPs son la fuente de mayor variación genética humana, pudiendo contribuir a la susceptibilidad de desarrollar la patología (Alshatwi *et al.*, 2011).

En enfermedades complejas, existen cambios en la secuencia de ADN que contribuyen a la susceptibilidad del individuo, manifestándose clínicamente su efecto combinado o interacción. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por *Single Nucleotide Polymorphisms*) son los que originan la mayor diversidad del genoma, y a pesar de que la mayoría son inocuos, debido a su proximidad pueden utilizarse como marcadores de cambios involucrados en enfermedades (Luque y Herráez Sánchez, 2000).

La importancia de los cambios en la secuencia nucleotídica reside, en primera instancia, en las repercusiones estructurales que puedan acarrear en las proteínas que codifican y, por ende, en la modificación de las funciones que desempeña la macromolécula en la célula. Una acumulación de estas fallas puede afectar, de la misma manera, al binomio estructura-función en los niveles crecientes de complejidad del organismo: tejidos, órganos y sistemas.

A pesar de que los SNPs constituyen la fuente de variación más importante en el genoma, la mayoría no posee efectos en las funciones celulares. Sólo el 1% provoca cambios en el producto proteico y se denominan no sinónimos (SNPsns). Esta baja frecuencia podría ser consecuencia de la selección en contra de los efectos deletéreos de la variación aminoacídica (Shen *et al.*, 2006). Asimismo, existen SNPs en regiones reguladoras del genoma (como los presentes en promotores e intrones) que pueden modificar los procesos responsables de la correcta expresión génica (Alencar y Lopes, 2010, Priya Doss *et al.*, 2008).

La magnitud de las consecuencias en la estructura y función proteicas se potencia a medida que aumentan las discrepancias entre los residuos involucrados en el cambio. Esto es debido a que se modifican las interacciones entre los aminoácidos, lo cual altera la estabilidad estructural de la proteína. Los resultados pueden variar desde la mantención de la función normal de la macromolécula hasta la pérdida total de su función, culminando en el mal funcionamiento de la célula y, luego, en algún tipo de patología.

Los polimorfismos pueden tener un efecto principal o marginal con respecto al riesgo de desarrollo de la enfermedad. Si el SNP presenta un efecto principal éste puede ser

detectado por un estudio de asociación mediante enfoques de regresión logística. Sin embargo, es acertado suponer que las enfermedades complejas deben ser controladas por mecanismos genéticos caracterizados por la acción conjunta de varios genes, teniendo cada gen un solo efecto marginal pequeño, tal vez porque la selección natural ha eliminado los genes que producen los efectos más grandes, y en este escenario, se deben analizar conjuntamente grupos de marcadores para el desarrollo de estudios de asociación, mediante la agrupación de marcadores en genotipos *multi-locus* para que la unidad básica del análisis estadístico sea el individuo (Crawford *et al.*, 2005).

Probablemente, la susceptibilidad al cáncer de mama esté influenciada por variaciones genéticas en genes de baja penetrancia, los cuales podrían tener un impacto considerable sobre la etiología de la enfermedad (Antoniou *et al.*, 2001; De Jong *et al.*, 2002). Actualmente, los avances de la biología molecular permiten en la actualidad un análisis simultáneo de múltiples genes que predisponen al cáncer de mama, tanto de penetrancia alta como intermedia (Economopoulou *et al.*, 2015).

Cambios en las regiones reguladoras o funcionalmente relevantes de genes implicados en la adhesión celular y vías de señalización, podrían favorecer la progresión tumoral y la metástasis. Reside allí su importancia como posibles blancos terapéuticos. Es por ello que los estudios de asociación tienen como principal objetivo detectar marcadores tempranos de susceptibilidad y de pronóstico de la enfermedad, contribuyendo al conocimiento de los mecanismos cancerígenos y al desarrollo de terapias antitumorales. Además, si bien existen nuevas terapias para el tratamiento del tumor, la aplicación de muchas de ellas depende del haplotipo que pueda presentar el paciente (farmacogenómica) (Bronchud *et al.*, 2000).

En la mayoría de los casos, el pronóstico y la elección en la terapia se basan solamente en el estadio de la enfermedad en el momento de presentación, lo cual no predice precisamente el porvenir de la enfermedad. De esta manera, es necesaria la identificación de nuevos marcadores de progresión de la enfermedad, con el objetivo de individualizar de manera acorde la terapia (McLeod y Murray, 1999). Si bien muchos factores no genéticos podrían influenciar los efectos de los medicamentos, existen numerosos ejemplos que muestran que las diferencias en las respuesta a las drogas son debidas a las variaciones en las secuencias (polimorfismos) de genes que codifican enzimas que metabolizan las drogas, las transportan o son sus blancos (Medeiros *et al.*, 2003; Roses, 2004).

Debido a que en la actualidad no son muchos los marcadores moleculares capaces de determinar con precisión si un paciente responderá positivamente a cierto tratamiento, numerosos estudios se han focalizado en la expresión de proteínas en tejidos tumorales y se

reconoce que las variantes genéticas individuales además podrían influenciar esta respuesta. La determinación de polimorfismos genéticos puede ser realizada a partir de muestras de sangre entera, evitando las técnicas invasivas, con la ventaja adicional de que puede ser llevada a cabo antes o después de cualquier tratamiento. Con el fin de optimizar las respuestas, minimizar la toxicidad y reducir los elevados costos asociados con las fallas en la quimioterapia, el análisis de un amplio rango de marcadores moleculares y polimorfismos genéticos podría contribuir al desarrollo de un perfil farmacogenómico, indicando el protocolo de quimioterapia más apropiado para cada paciente individual (Pinto *et al.*, 2005). Por ejemplo, una de las terapias moleculares dirigidas en mujeres con cáncer de mama HER2 positivo (por sobreexpresión o amplificación del gen) es el bloqueo del receptor HER2/neu mediante la utilización del anticuerpo Herceptin.

La medicina personalizada es una gran promesa para precisar los agentes terapéuticos que han de ser dirigidos a la biología molecular única de un paciente con cáncer. Sin embargo, a pesar de muchos años de investigación en biomarcadores, solamente unos pocos muestran el valor predictivo suficiente, el rendimiento analítico, y pruebas rigurosas para establecer su utilidad clínica en el tratamiento de cáncer de mama. Idealmente, el tratamiento podría ser individualizado racionalmente de tal manera que los pacientes con un alto riesgo de recaída podrían ser tratados basado en las características moleculares de su tumor, mientras que los de menor riesgo pueden prescindir de la toxicidad potencial de un tratamiento dado. A medida que los estudios en biomarcadores se vuelven cada vez más complejos, existe una necesidad crítica de establecer rigurosamente la validación analítica y clínica de estos estudios (Lang *et al.*, 2015).

De esta manera, la medicina personalizada actual ha cambiado los paradigmas en oncología, ya que se focaliza principalmente en el entendimiento de la carcinogénesis molecular, la farmacogenómica y las diferencias genéticas individuales que determinan la respuesta a la quimioterapia. Este nuevo paradigma ha creado nuevas oportunidades y desafíos en el desarrollo de drogas y cuidados clínicos (Madhu, 2015).

En los últimos años, numerosas plataformas de genotipificación múltiple están siendo evaluadas para la determinación de mutaciones oncogénicas *hotspots*, amplificaciones génicas y re-arreglos, con resultados prometedores que avanzan hacia su implementación en la práctica clínica. El principal desafío en el tratamiento personalizado del cáncer, que involucra la traducción genómica de la patología, es entender cómo estas alteraciones se relacionan con su progresión a través del tiempo. A pesar de esta brecha de conocimiento, los avances en la identificación de biomarcadores utilizando tecnologías genómicas continúan

haciendo grandes progresos, y se mantienen como una gran promesa para avanzar en el tratamiento del cáncer (Madhu, 2015).

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo muestran un grado de asociación (de menor o mayor susceptibilidad) entre los SNPs de genes implicados en la proliferación y supervivencia con el cáncer de mama, sería conveniente aumentar el tamaño muestral para ratificar o rectificar las frecuencias genotípicas observadas, potenciar el análisis estadístico y sumar estudios de expresión génica para entonces proponer efectivamente o no, la utilidad de estos polimorfismos como biomarcadores genéticos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del presente trabajo se concluye que:

- ❖ La mutación *hotspot* H1047R en el exón 20 de *PIK3CA* mostró una asociación significativa con la susceptibilidad de desarrollo de cáncer de mama. De este modo, el genotipo heterocigota AG (His/Arg) aumentaría hasta 20 veces el riesgo de desarrollar esta neoplasia en mujeres portadoras del mismo. Este riesgo se incrementaría hasta 25 veces por la presencia de cualquiera de las dos variantes G ó T (Arg ó Leu) en la posición 1047. Además, el análisis de haplotipos mostró que los individuos que heredan los haplotipos (GGG y GGK) portadores de las variantes G y K en la posición 1047, presentan entre 17-18 veces más probabilidad de desarrollar cáncer de mama que aquellos que no lo presentan, ratificando el riesgo observado en el análisis de los genotipos por separado.
- ❖ De manera similar, el polimorfismo -938C>A en el promotor de *Bcl2*, mostró una asociación significativa con la susceptibilidad de desarrollar de cáncer de mama. La presencia de esta variante aumentaría en un 70% el riesgo de desarrollar esta neoplasia respecto de aquellos individuos que no lo presentan. Además, este riesgo aumentaría de acuerdo al número de copias del alelo variante (A), de manera que los homocigotas (AA) tienen más riesgo que los heterocigotas (CA). Este riesgo sería más evidente en mujeres menores de 55 años, con invasión linfovascular positiva, receptor de HER2 negativo, grado histológico II y periodo menopáusico sin distinción (pre y post-menopáusico).
- ❖ Por el contrario, el análisis de asociación del SNP -248G>A de *BAX* mostró que los individuos portadores de 2 copias del alelo variante (AA) presentan una probabilidad menor al 20% de desarrollar cáncer de mama a diferencia de los heterocigotas que portan una sola copia (GA). De modo que este SNP estaría actuando como un factor protector, confiriendo una menor susceptibilidad frente al desarrollo de esta neoplasia, principalmente en mujeres homocigotas (AA) que presentan invasión linfovascular positiva; receptores de progesterona y estrógeno positivos; receptor HER2 negativo y grado histológico II.
- ❖ Por otra parte, los polimorfismos I655V del gen *HER2*; A380T del gen *ITGa6*; E542K y E545K de *PIK3CA* no mostraron asociación con el desarrollo de cáncer de mama en la población de mujeres estudiadas.
- ❖ Así mismo, no se identificaron individuos portadores de las variantes W452C de *HER2*, R1281W de *ITGβ4* y E17K de *AKT1*; estos resultados podrían estar reflejando su alto

impacto deletéreo en las proteínas, de manera que serían eliminadas de la población por la selección natural.

- ❖ El análisis de los polimorfismos a través del algoritmo MDR reveló que existe interacción entre ellos. El modelo de cuatro-factores (cuatro-*loci*) conformado por *HER2-ITGa6-BAX-BCL2* fue estadísticamente significativo (TA=0,81; $p<0,05$), y el valor positivo de entropía, estaría indicando que existe una interacción sinérgica entre éstos SNPs en relación al riesgo de desarrollar cáncer de mama. Además, esta interacción es indicativa de genes de vías de señalización que actúan secuencialmente, donde los genes ubicados corriente arriba de la vía son epistáticos sobre los más “bajos” y sugiere un intercambio biológico de información (*cross-talk*) entre genes implicados en la proliferación, adhesión celular y la vía apoptótica.
- ❖ Los resultados obtenidos en este estudio apoyan el rol modificador de la susceptibilidad genética de los individuos en la etiología del cáncer de mama. Los polimorfismos presentes en los genes *PIK3CA*, *BAX* y *BCL2* mostraron asociación con la susceptibilidad de desarrollo de cáncer de mama en la población estudiada. Por lo tanto, estos polimorfismos asociados a genes implicados en la proliferación celular y la apoptosis, tendrían una potencial utilidad como biomarcadores genéticos para la identificación de individuos con una susceptibilidad diferencial de desarrollar esta neoplasia.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams JR, Schachter NF, Liu JC, Zacksenhaus E, Egan SE (2011).** Elevated PI3K Signaling Drives Multiple Breast Cancer Subtypes. *Oncotarget*; 6(2):435-447.
- Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M, Lunderberg J (2000).** Single nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analytical Biochemistry*; 280:103-110.
- Akisik E, Dalay N (2004).** Estrogen receptor codon 594 and HER2 codon 655 polymorphisms and breast cancer risk. *Experimental and Molecular Pathology*; 76:260-263.
- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1986).** The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*; 232:1644-6.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2008).** *Biología Molecular de la célula*. 5ª ed. [s.l.]: Omega; pp 1498.
- Alencar SA, Lopes JCD (2010).** A comprehensive *In silico* analysis of the functional and structural impact of SNPs in the IGF1R gene. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 2010:1-8.
- Alshatwi A, Shafi G, Hasan TN, Alsaif AA, Amal A, Alsaif MA, Lei DKY (2011).** Single Nucleotide Polymorphisms in the p21 and bcl2 Cancer Susceptibility Genes and Breast Cancer Risk in Saudi Arabia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; 12:2607-2610.
- Altomare DA, Testa JR (2005).** Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*; 24:7455-7464.
- Amadori D, Maltoni M, Volpi A, Nanni O, Scarpi E, Renault B, Pellegata NS, Gaudio M, Magni E, Ranzani GN (1997).** Gene amplification and proliferative kinetics in relation to prognosis of patients with gastric carcinoma. *Cancer*; 79:226-232.
- American Cancer Society (2011).** *Global Cancer Facts Figures*. 2ª ed. Atlanta: American Cancer Society.
- Ameyaw MM, Thornton N, McLeod HL (2000).** Re: population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of the Natinal Cancer Institute*; 92:1947-1948.
- Ameyaw MM, Tayeb M, Thornton N, Folayan G, Tariq M, Adjei DO, McLeod HL (2002).** Ethnic variations in the HER-2 codon 655 genetic polymorphism previously associated with breast cancer. *Journal of Human Genetics*; 47:172-175.
- Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, Easton D (2001).** Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genetic Epidemiology*; 21:1-18.

- Arcaro A y Guerreiro AS (2007).** The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Human Cancer: Genetic Alterations and Therapeutic Implications. *Current Genomics*; 5(8):271-306
- Bachmann H S, Otterbach F, Callies R, Nüchel H, Bau M, Schmid K W, Kimmig R (2007).** The AA genotype of the regulatory BCL2 promoter polymorphism (938C>A) is associated with a favorable outcome in lymph node negative invasive breast cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*; 13(19):5790-7.
- Balding DJ (2006).** A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews Genetics*; 7:781-91.
- Barbisan G (2014).** Análisis de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en genes asociados a la infección por el virus del Papiloma Humano (VPH) y la progresión neoplásica: un modelo poligénico de susceptibilidad al cáncer cervical. Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.
- Barbisan G, Contreras A, Pérez LO, Difranza L, Golijow CD (2011).** The effect of TP53 codon 72 and RNASEL codon 462 polymorphisms on the development of cervical cancer in Argentine women. *Cancer Genetics*; 204(5):270-7.
- Baretta L, Cappiello F, Moore JH, Barili M, Greene CS, Scorza R (2008).** Ability I epistatic interactions of Cytokine Single Nucleotide Polymorphisms to predict susceptibility to disease subsets in systemic sclerolosis patients. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)*; 59(9):974-983.
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA (1986).** The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*; 319:226-30.
- Baxter SW, Campbell IG (2001).** Re: population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of the Natinal Cancer Institute*; 93: 557-558.
- Beauclair S, Formento P, Fischel JL, Lescaut W, Largillier R, Chamorey E, Hofman P, Ferrero JM, Page G, Milano G (2007).** Role of the HER2 [Ile655Val] genetic polymorphism in tumorogenesis and in the risk of trastuzumab-related cardiotoxicity. *Annals of Oncology*; 18:1335-1341.
- Bellascosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR (2005).** Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research*; 94: 29-86.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995).** Controlling the false Discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society SB*; 57:289-300.

- Benusiglio PR, Lesueur F, Luccarini C, Conroy DM, Shah M, Easton DF, Day NE, Dunning AM, Pharoah PD, Ponder BAJ (2005).** Common ERBB2 polymorphisms and risk of breast cancer in a white British population: a case-control study. *Breast Cancer Research*; 7:204-209.
- Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarkepearson DL, Marks P, McKenzie S, Yin S, Bast RC (1990).** Overexpression of Her2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian-cancer. *Cancer Research*; 50: 4087-4091.
- Beretta L, Cappiello F, Moore JH, Barili M, Greene CS, Scorza R (2008).** Ability of epistatic Interactions of Cytokine Single-Nucleotide Polymorphisms to predict susceptibility to disease subsets in systemic sclerosis patients. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)*; 59(7):974-983.
- Bon G, Folgiero V, Bossi G, Felicioni L, Marchetti A, Sacchi A, Falcioni R (2006).** Loss of beta4 integrin subunit reduces the tumorigenicity of MCF7 mammary cells and causes apoptosis upon hormone deprivation. *Clinical Cancer Research*; 12(11 Pt 1):3280-7.
- Bon G, Folgiero V, Di Carlo S, Sacchi A, Falcione R (2007).** Involvement of $\alpha 6\beta 4$ in the mechanisms that regulate breast cancer progression. *Breast Cancer Research*; 9:1-203.
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmins BA (2004).** Advances in protein kinase B signaling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Science*; 29:233-42.
- Breyer JP, Sanders ME, Airey DC, Cai Q, Yaspan BL, Schuyler PA, Dai Q, Boulos F, Olivares MG, Bradley KM, TangGao Y, Page DL, Dupont WD, Zheng W, Smith JR (2009).** Heritable Variation of ERBB2 and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*; 18(4):1252-58.
- Brodbeck D, Cron P, Hemmings BA (1999).** A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *Journal of Biological Chemistry*; 274(14):9133-6.
- Brodbeck D, Hill MM, Hemmings BA (2001).** Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *Journal of Biological Chemistry*; 276(31):29550-8.
- Bronchud M, Foote M, Peters W, Robinson M (2000).** Principles of molecular oncology (1^a ed.). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Brown R (1996).** The bcl-2 family of proteins. *British Medical Bulletin*; 53(3):466-477.

- Brugge J, Hung MC, Mills GB (2007).** A New Mutational *akt*ivation in the PI3K Pathway. *Cancer Cell*; 12:104-107.
- Cariaga Martínez AE, Zapata PD (2007).** El laboratorio de biología molecular. (Edición ampliada). Posadas: Editorial Universitaria de Misiones.
- Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE (2007).** A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*; 448:439-444.
- Chacón R, Constanzo M (2010).** Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*; 12(2):S3.
- Chan SL, Yu VC (2004).** Proteins of the Bcl-2 Family in Apoptosis Signalling: From Mechanistic Insights to Therapeutic Opportunities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 31:119-128.
- Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN (1999).** AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annual Review of Biochemistry*; 68:965-1014.
- Chen J, Zhu R, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler A, Simon R, Graham S (1996).** Expression of the Apoptosis-Effector Gene, Bax, IsUp-Regulated in Vulnerable Hippocampal CalNeurons Following Global Ischemia. *Journal of Neurochemistry*; 67:64-71.
- Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W, Wei Q (2007).** Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*; 28(9):2008-12.
- Chen M, Sinha M, Luxon B, Bresnick A, O'Connor K (2009).** Integrin $\alpha 6\beta 4$ controls the expression of genes associated with cell motility, invasion and metastasis, including S100A4/Mestastasin. *The Journal of Biological Chemistry*; 284(3):1484-1494.
- Choudhury JH, Ghosh SK (2014).** Gene-environment interaction and susceptibility in head and neck cancer patients and in their first-degree relatives: a study of Northeast Indian population. *Journal of Oral Pathology & Medicine*; 44(7):495-501.
- Clayton DG, Walker NM, Smyth DJ, Pask R, Cooper JD, Maier LM, Smink LJ, Lam AC, Ovington NR, Stevens HE, Nutland S, Howson JM, Faham M, Moorhead M, Jones HB, Falkowski M, Hardenbol P, Willis TD, Todd JA (2005).** Population

- structure, differential bias and genomic control in a largescale, case-control association study. *Nature Genetics*; 37:1243-46.
- Coronato S**, Laguens GE, Spinelli OM, Di Girolamo W (2002). Marcadores tumorales en cancer de mama. *Medicina*; 62:73-82.
- Courtney KD**, Corcoran RB, Engelman JA (2010). The PI3K Pathway As a Drug Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*; 6(28)1075-1083.
- Coussens L**, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*; 230:1132-9.
- Crawford DC**, Akey DT, Nickerson DA (2005). The patterns of natural variation in human genes. *Annual Review of Genomics Human Genetics*; 6:287-312.
- Daidone MG**, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R (1999). Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocrine-Related Cancer*; 6:61-68.
- De Jong**, MM, Nolte I, Te Meerman GJ, Van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, De Vries EG (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *Journal of Medical Genetics*; 39:225-242.
- Deng HW**, Chen WM, Recker RR (2001). Population admixture: detection by Hardy-Weinberg test and its quantitative effects on linkage-disequilibrium methods for localizing genes underlying complex traits. *Genetics*; 157: 885-897.
- Diaz L**, Cristofanilli M, Zhou X, Welch K, Smith T, Yang Y, Sneige N, Sahin A, Gilcrease M. (2005). $\beta 4$ Integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. *Modern Pathology*; 18:1165-1175.
- Dirección de Estadística del Ministerio de Salud e Información en Salud (2013)**. Estadísticas vitales 2013; Serie 5, N°57. <http://www.deis.gov.ar/>. [Consultado el día 16 de Septiembre de 2015].
- Eccles SA (2001)**. The role of c-erbb-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*; 6(4):393-406.
- Economopoulou P**, Dimitriadis G, Psyrris A (2015). Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treatment Reviews*; 41:1-8.
- Edlich F**, Banerjee S, Suzuki M, Cleland M, Arnoult D, Wang C, Youle R (2011). Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*; 145:104-16.
- Engelman JA**, Luo J; Cantley LC (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*; 7:606-619.

- Esser C, Tomluk J (2005).** Reporting Hardy-Weinberg tests in case control studies: reasons for caution but not for panic reactions. *Journal of Investigative Dermatology*; 124:1082-1083.
- Evans DM, Marchini J, Morris AP, Cardon LR (2006).** Two-stage twolocus models in genome-wide association. *PLoS Genetics*; 2:1-157.
- Excloffier L, Stalkin M (1995).** Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*; 12:921-7.
- Fleishman SJ, Schlessinger J, Ben-Tal N (2002).** A putative molecular activation switch in the transmembrane domain of erbb2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 99:15937-15940.
- Fontanini G, Vignatil S, Bigini D, Mussi A, Lucchi, M, Angeletti C A, Bevilacqua G (1992).** Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non small cell lung cancer. *British Journal of cancer*; 71:1003-1007.
- Frank B, Hemminki K, Wirtenberger M, Bermejo JL, Bugert P, Klaes R, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Bartram CR, y Burwinkel B (2005).** The rare ERBB2 variant Ile654Val is associated with an increased familial breast cancer risk. *Carcinogenesis*; 26(3):643-647.
- Frendi A, Khabir A, Mnejja W, Sellami- Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Ghorbel A, Gargouri A y Mokdad-Gargouri R (2009).** PIK3CA amplifications is predictive of poor prognosis in Tunisian patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Science*; 11(100):2034-2039.
- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Beldainiesta C, Gonzalez-Baron M (2004).** PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*; 30(2):193-204.
- Gabarra V, Cho S, Ramirez M, Ren Y, Chen LL, Cheung A, Cao X, Rennard R, Unruh KR, Graff CP, Browning B, Huet HA, McLachlan K (2010).** Antibodies directed to alpha6beta4 highlight the adhesive and signaling functions of the integrin in breast cancer cell lines. *Cancer Biology & Therapy*; 15(6):437-45.
- Gabelli SB, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Vogelstein B y Amzel M (2010).** Somatic mutations in PI3K α : structural basis for the enzyme activation and drug design. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1804(3):533.
- García M, Vecino E (2003).** Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*; 78(7):351-364.
- Georges-Labouesse E, Mark M, Messaddeq (1998).** Essential role of $\alpha 6$ integrins in cortical and retinal lamination. *Current Biology*; 8:983-986.

- González del Río R (2011)**. Implicaciones pronósticas en los subtipos moleculares de cáncer de mama. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Salamanca, Salamanca, España.
- Gonzalez-Hormazabal P, Musleh M, Bustamante M, Stambuk J, Escandar S, Valladares H, Lanzarini E, Chiong H, Rojas J, Castro VG, Rubio-Reyes C, Jara L, Berger Z (2014)**. Role of cytokine gene polymorphisms in gastric cancer risk in Chile. *Anticancer Research*; 34(7):3523-30.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer S J, Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999)**. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*; 13:1899-1911.
- Guo W, Giancotti F (2004)**. Integrin signalling during tumour progression. *Nature*; 5:816-826.
- Györfy B, Kocsis I, Vászrhelyi B (2004)**. Biallelic genotype distributions in papers published in Gut between 1998 and 2003: altered conclusions after recalculating the Hardy-Weinberg equilibrium. *Gut-BMC Journal*; 53:614-615.
- Han W, Kang D, Lee JE, Park IA, Choi JY, Lee KM, Bae JY, Kim S, Shin ES, Lee JE, Shin HJ, Kim SW, Kim SW, Noh DY (2005)**. A Haplotype Analysis of HER-2 Gene Polymorphisms: Association with Breast Cancer Risk, HER-2 Protein Expression in the Tumor, and Disease Recurrence in Korea. *Clinical Cancer Research*; 11:4775-4778.
- Harari D, Yarden Y (2000)**. Molecular mechanisms underlying *ErbB2/HER2* action in breast cancer. *Oncogene*; 19:6102-6114.
- Hardin J, Bertoni G, Kleinsmith LJ (2011)**. Becker's World of the Cell. 8^a ed. [s.l.]: B Cummings; [sin paginar].
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005)**. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*; 4:988-1004.
- Hervent AS, Keulenaer GW (2012)**. Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity Induced by ErbB Receptor Inhibitor Cancer Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*; 13:12268-12286.
- Hishida A, Hamajima N, Iwata H, Matsuo K, Hirose K, Emi N, Tajima K (2002)**. Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*; 94:1807-8.
- Houlston RS, Peto J (2004)**. The search for the low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*; 23:6471-6476.
- Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB, Amzel LM (2007)**. The structure of human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science*; 318:1744-1748.

- Huang CH, Mandelker D, Gabelli SB, Amzel LM (2008).** Insights into the Oncogenic Effects of PIK3CA Mutations from the Structure of p100 α /p85 α . *Cell Cycle*; 7(9):1151-1156.
- Hunter DJ (2005).** Gene-environment interactions in human diseases. *Nature Review Genetics*; 6:287-98.
- Hynes NE, Stern DF (1994).** The biology of erbB-2/neu/HER2 and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1198:165-84.
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V (2005).** Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*; 19(4):333-341.
- Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG (2003).** Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet*; 361:567-71.
- Iracheta MAI (2007).** El suicidio y la muerte celular. *Revista de La Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*. VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. 101(2).
- Jie S, Deininger PL, Zhao H (2006).** Applications of computational algorithm tools to identify functional SNPs in cytokine genes. *Cytokine*; 35:62-66.
- Jo UH, Han GL, Seo JH, Park KH, Lee JW, Lee HJ, Ryu JS, Kim YH (2008).** The genetic polymorphisms of HER-2 and the risk of lung cancer in a Korean population. *BMC Cancer*; 8:1-359.
- Kada F, Saji M, Ringel MD (2004).** Akt: a potential target for thyroid cancer therapy. *Current Drug Targets - Immune Endocrine & Metabolic Disorders*; 4(3):181-5.
- Keshava C, McCanlies EC, Keshava N, Wolff MS, Weston A (2001).** Distribution of HER2 V655 genotypes in breast cancer cases and controls in the United States. *Cancer Letters*; 173:37-41.
- Kholoussi NM, El-Nabi SEH, Esmail NN, Abd El-Bary NM, El-Kased AF (2014).** Evaluation of Bax and Bak gene mutations and expression in breast cancer. *BioMed Research International*. p:1-9.
- Kidd LR, CoulibalyA, TempletonTM, ChenW, LongLO, Mason T, BonillaC, AkereyeniF, FreemanV, IsaacsW, AhaghotuCandy KittlesRA (2006).** Germline BCL-2 sequence variants and inherited pre- disposition to prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*. 9:284-292.
- Kim MS, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH British (2008).** Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Journal of Cancer*; 98:1533-1535.

- Kim S, Kim D, Oh I, Song J, Kwon K, Choe B, Kim Y (2011).** A missense polymorphism (rs11895564, Ala380Thr) of integrin alpha6 is associated with the development and progression of papillary thyroid carcinoma in Korean population. *The Korean surgical Society*; 308-315.
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985).** Amplification of a novel v-erbB related gene in a human mammary carcinoma. *Science*; 229:974-6.
- Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y (2000).** Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signalling network of growth factor receptors. *Advances in Cancer Research*; 77:25-79.
- Klos KS, Zhou X, Lee S, Zhang L, Yang W, Nagata Y, Yu D (2003).** Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone. *Cancer*; 98(7):1377-1385.
- Koster J, Kuikman I, Kreft M, Sonnenberg A (2001).** Two different mutations in the cytoplasmatic domain of the integrin $\beta 4$ subunit in nonlethal forms of epidermolysisbullosa prevent interaction of $\beta 4$ with plectin. *Journal of Investigative Dermatology*; 117:1405-2001.
- Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius V-M, Niskanen E, Reed JC (1995).** Reduced expression of pro-apoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Research*; 55:4471-4478.
- Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, Frenkel V, Robertson S, Ionov Y, Yamamoto H, Perucho M, Takayama S, Reed JC (1999).** Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*; 6:29-40.
- Kruszyna L, Lianeri M, Roszak A, Jagodziński PP (2010).** HER2 codon 655 polymorphism is associated with advanced uterine cervical carcinoma. *Clinical Biochemistry*; 43:545-548.
- Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Purohit R (2013).** AKT Kinase Pathway: A Leading Target in Cancer Research. *The Scientific World Journal*. Vol:2013, ArtID: 756134, pp:6.
- Kuznetsova I, Kozlova N, Rakitin S, Dmitrieva A (2012).** Polymorphism of Cell Cycle Regulating Genes Bcl-2 (-938C>A), Bax (-248G>A) and P27 (-326T>G) and the Risk of Lung Cancer. *International Journal Biomedicine*; 2: 197-200.
- Lang JE, Wechsler JS, Michael F. Press MF, Tripathy D (2015).** Molecular Markers for Breast Cancer Diagnosis, Prognosis and Targeted Therapy. *Journal of Surgical Oncology*; 111:81-90.

- Lavender NA**, Benford ML, VamCleave TT, Brock GB, Kittle RA, Moore JH, Hein DW, Kidd LCR (2009). Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and prostate cancer risk among men of African descent: a case-control study. *BMC Cancer*; 9:397.
- Lazcano Ponce E**, Salazar-Martínez E, Hernández-Avila M (2001). Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública de Mexico*; 43(2):135-150.
- Lee S**, Hou MF, Hsieh PC, Wu SH, Hou L, Ma Se, Tsai SM, Tsai LS (2008). A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism and risk of breast cancer in Taiwan. *Clinical Biochemistry*; 41:121-125.
- Lehnerdt GF**, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelav A, Nüchel H, Lang S, Schmid KW, Siffert W y Bachmann HS (2009). The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology*; 20(6):1094-9.
- Leong Ching-Shian V**, Jabalb MF, Leong PP, Abdullahc AM, Gulb YA, Seowa HF (2008). PIK3CA gene mutations in breast carcinoma in Malaysian patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*; 187:74-79.
- Li H**, Zhu R, Wang L, Zhu T, Li Q, Chen Q, Wang H, Zhu H (2010). PIK3CA mutations mostly begin to develop in ductal carcinoma of the breast. *Experimental and Molecular Pathology*; 88:150-155.
- Liang X**, Lou QC, Salto-Tellez M, Putti TC, Loh M, Sukumar S (2006). Mutational Hotspot in Exon 20 in Breast cancer Among Singapore Chinese. *Cancer Biology and Therapy*; 5(5):544-8.
- Lipscomb EA**, Simpson KJ, Lyle SR, Ring JE, Dugan AS, Mercurio AM (2005). The alpha6beta4 integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells in vivo. *Cancer Research*; 1;65(23):10970-6.
- Liu W**, Bagaitkar J, Watabe K (2007). Roles of AKT signal in breast cancer *Frontiers in Bioscience*; 12:4011-4019.
- Lodish H**, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J (2005). *Biología Celular y Molecular*. 5ª ed. [s.l.]: Panamericana; pp 967.
- Luna-López A**, López-Díaz Guerrero NE, González-Puertos VY, Triana-Martínez F, Fainstein MK (2008). El fantástico mundo proteína Bcl-2. *Revista de Educación Bioquímica*; 27(3):93-102.

- Luque Cabrera J, Herráez Sánchez A (2002).** Texto ilustrado de Biología Molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Madrid: Elsevier Science; pp 490.
- Madhu K (2015).** Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism Clinical and Experimental*; 64:S16-S21.
- Mahmoud IS, Sughayer MA, Mohammad HA, Eshtayeh AA, Awidi AS, EL-Khateeb MS, Ismail MS (2008).** *British Journal of Cancer*; 99:488-490.
- Malanga D, Scrima M, De Marco C, Fabiani F, De Rosa N, De Gisi S, Malara N, Savino R, Rocco G, Chiappetta G, Franco R, Tirino V, Pirozzi G, Viglietto G (2008).** Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle*; 7(5):665-9.
- Mandelker D, Gabelli S, Schmidt-Kittler O, Zhu J, Huang C, Kinsler K, Vogelstein B, Amzel L (2009).** A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3Ka and the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 106(40):16996-7001
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004).** Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International Journal of Radiation Oncology - Biology - Physics*; 58: 903-913.
- Martínez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA y Gerner EW (2003).** Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. 6ª ed. Volumen 5: cap 1: Molecular Biology of cancer. [s.l.]: D.J. Abraham.
- Martínez-Arribas F, Martín-Garabato E, Zapardiel I, Sánchez J, Lucas AR, Tejerina A, Schneider J (2008).** Bax expression in untreated breast cancer: An immunocytometric study of 255 cases. *Anticancer Research*; 28(5):2595-2598.
- McKay JA, Loane JF, Ross VG, Ameyaw MM, Murray GI, Cassidy J, McLeod HL (2002).** c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*; 86:568-573.
- McLeod HL, Murray GI (1999).** Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*; 79: 191-203.
- Medeiros R, Pereira D, Afonso N, Palmeira C, Faleiro C, Afonso-Lopes C, Freitas-Silva M, Vasconcelos A, Costa S, Osorio T, Lopes C (2003).** Platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *International Journal of Clinical Oncology*; 8:156-161.

- Mercurio A, Rabinovitz I, Shaw L (2001).** The $\alpha 6\beta 4$ integrin and epithelial cell migration. *Cell Biology*; 13:541-545.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988).** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*; 16:1215.
- Ministerio de Salud Pública del Gobierno de la Provincia de Misiones, 2014.** Informe de estadísticas vitales. <http://www.salud.misiones.gov.ar/>. [Consultado el día 16 de Septiembre de 2015].
- Miyashita T, Reed J C (1994).** Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. *Cell*; 80, 293–299.
- Moore JH (2003).** The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Human Heredity*; 56:73-82.
- Moore JH (2013).** Tutorial MDR: Part 5– Interpretation. <http://www.epistasis.org/mdr.html>. [Consultado el mes de Julio 2015].
- Moshynska O, Moshynskyy I, Misra V, Saxena A (2005).** G125A single-nucleotide polymorphism in the human BAX promoter affects gene expression. *Oncogene*; 24(12):2042–9.
- Motsinger AA, Ritchie MD (2006).** Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Human Genomics*; 2(5):318-328.
- Mukohara T (2015).** PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer: Targets and Therapy*; 7:111–123.
- Naidu R, Yip CH, TAIB NA (2008).** Polymorphisms of HER2 Ile655Val and cyclin D1 (CCND1) G870A are not associated with breast cancer risk but polymorphic allele of HER2 is associated with nodal metastases *Neoplasma*; 55(2):87-95.
- Nalejska E, Maczwynska E (2014).** Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Molecular Diagnosis & Therapy*; 18:273–84.
- Nelson SE, Gould MN, Hampton JM, Trentham-Dietz A (2005).** A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer. *Breast Cancer Research*; 7:R357-R364.
- Nilsson TK, Johansson CA (2004).** A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the $_13910$ C/T polymorphism with pyrosequencing technology. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*; 39:287-290.
- Nuckel H, Frey U, Sellmann L, Bau M, Dürig J, Duhrsen, U, Siffert, W (2006).** Bax gene G(-248)A promoter polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of association with incidence, disease stage and progression-free survival. *Leukemia*; 20:1-724.

- Page GP, George V, Go RC; Page PZ, Allison DB (2003).** Are we there yet? : Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *The American Journal of Human Genetics*; 73:711-19.
- Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N (2000).** HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for breast cancer. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *Journal of the National Cancer Institute*; 92: 1991-1998.
- Papewalis J, Nikitin AY, Rajewsky MF (1991).** G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic Acids Research*; 19:5452.
- Paul MK, Mukhopadhyay AK (2004).** Tyrosine kinase-Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences*; 1(2): 101-115.
- Pereda J, Ortega E, Alonso-García N, Gómez-Hernández M, Sonnenberg A (2009).** Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes. *Cell Adhesion and Migration*; 3(4):361-364.
- Pinto D, Pereira D, Portela C, Leal da Silva J, Lopes C, Medeiros R (2005).** The influence of HER2 genotypes as molecular markers in ovarian cancer outcome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 335:1173-1178.
- Plas DR, Thompson CB (2005).** Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene*; 24: 7435-7442.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005).** Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Review Genetics*; 6:847-59.
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001).** The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer*; 8:11-31.
- Priya Doss CG, Sudandiradoss C, Rajasekaran R, Rao Sethumadhavan (2008).** Applications of computational algorithm tools to identify functional SNPs. *Functional & Integrative Genomics*; 8:309-316.
- Pulkkinen L, Rouan F, Bruckener-Tuderman L, Wallerstein R, Garzón M, Brown T, Smith L, Carter W, Uitto J (1998).** Novel ITGB4 mutations in lethal and nonlethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense versus nonsense. *The American Journal of Human Genetics*; 63:1376-1387.
- Rabinovitz I, Gipson IK, Mercurio AM (2001).** Traction forces mediated by alpha6beta4 integrin: implications for basement membrane organization and tumor invasion. *Molecular Biology of the Cell*; 12(12):4030-43.

- Rajasekaran R**; George Priya Doss C; Sudandiradoss C; Ramanathan K; Rituraj Purohit; Rao Sethumadhavan (2008). Effect of deleterious nsSNP on the HER2 receptor based on stability and binding affinity with herceptin: A computational approach. *Comptes Rendus Biologies*; 331:409–417.
- Ritchie MD**, Han LW, Roodi N, Bailey R, Dipont WD Parl FF, Moore JH (2001). Multifactor Dimensionality Reduction Reveals Hight-Order Interactions among Estrogen Metabolism genes in Sporadic Breast Cancer. *American Journal of Human Genetics*; 69:138-147.
- Rojas M**, Salmen S, Berrueta L (2009). Muerte celular programada: Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa, ULA*; 4(3):92-106.
- Roses AD** (2004). Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. *Nature Review Genetics*; 5:645–656.
- Ross JS**, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Puztai L, Bloom KJ (2003). The HER2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*; 8: 307–325.
- Rozen S**, Skaletsky HJ (2000). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Nueva Jersey, Humana Press.
- Sahu SK**, Choudhuri T (2013). Lack of association between Bax promoter (-248G>A) single nucleotide polymorphism and susceptibility towards cancer: evidence from a meta-analysis. *PlosOne*; 8(10):1-11.
- Samuels Y**, Velculescu VE (2004). Oncogenic mutations of *PIK3CA* in human cancers. *Cell Cycle*; 3(10):1221-4.
- Samuels Y**, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2004). High Frequency of Mutations of the *PIK3CA* Gene in Human Cancers. *Science*; 304(5670):554.
- Samuels Y**, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B y Velculescu VE (2005). Mutant *PIK3CA* promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*; 7: 561-73.
- Samuels Y**, Waldman T (2010). Oncogenic mutations of *PIK3CA* in human cancers. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 347:21-41.
- Santiago MB**, DE Lima Marson FA, Secolin R, Ribeiro JD, Lima CS, Bertuzzo CS (2014). SLC23A2-05 (rs4987219) and KRAS-LCS6 (rs61764370) polymorphisms in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncology Letters*; 7(6):1803-1811.

- Satiroglu-Tufan LN, Bir F, Calli-Demirkan N (2006).** Investigation of HER-2 codon 655 single nucleotide polymorphism frequency and c-ErbB-2 protein expression alterations in gastric cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*; 12(20): 3283-3287.
- Saxena A, Moshynskaa O, Sankaranb K, Viswanathana S y Sheridanc DP (2002).** Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Letter*; 187:199-205.
- Saxena N, Katiyar SP, Liu Y, Grover A, Gao R, Sundar D, Kaul SC, Wadhwa R (2013).** Molecularinteractions of Bcl-2 and Bcl-xL with mortalin: Identification and functional characterization. *Bioscience Reports*; 33(5), art:e00073.
- Schaid DJ, Jacobsen SJ (1999).** Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *American Journal of Epidemiology*; 149:706-711.
- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA (1984).** The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*; 312:513-6.
- Schuller U, Ruiter M, Herms J, Kretzschmar HA, Grasbon-Frodl E (2008).** Absence of mutations in the AKT1 oncogene in glioblastomas and medulloblastomas. *Acta Neuropathologica*; 115:367-368.
- Schulz WA (2007).** Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook. Springer:Dordrecht. 978-1-4020-3186-1.
- Secretaría de Salud, México (2002).** Compendio de anatomía patológica de la glándula mamaria.
- Shen J, Prescott L. Deininger, Hua Zhao (2006).** Applications of computational algorithm tools to identify functional SNPs in cytokine genes. *Cytokine*; 35 62-66.
- Shi TY, Zhu ML, He J, Wang MY, Li QX, Zhou XY, Sun MH, Shao ZM, Yu KD, Cheng X, Wu X, Wei Q (2013).** Polymorphisms of the Interleukin 6 gene contribute to cervical cancer susceptibility in Eastern Chinese women. *Human Genetics*; 132(3):301-12.
- Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U (1994).** The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*; 86:499-504.
- Skogsberg S, Tobin G, Kröber A, Kienle D, Thunberg U, Aleskog A, Rosenquist R (2006).** The G (-248) A polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate

- with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*; 20(1):77-81.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, D.E. Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Mcguire WL (1987).** Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*; 244(4905):707-712.
- Sorlie T, Perou C, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen M, Van de Rijn M, Jeffrey S, Thorsen T, Quist H, Matese J, Brown P, Botstein D, Lønning P, Børresen-Dale A (2003).** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14):8418-8423.
- Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D y Fegan C (2005).** Common polymorphism G (-248) A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. *Journal of Clinical Oncology*; 23(7):1514-21.
- Sundaresan S, Penuel E, Sliwkowski M (1999).** The biology of human epidermal growth factor receptor 2. *Current Oncology Report*; 1:16-22.
- Tagliabue E, Ghirelli C, Squicciarini P, Aiello P, Colnaghi M, Ménard S (1998).** Prognostic value of $\alpha 6\beta 4$ integrin expression in breast carcinomas is affected by laminin production from tumor cells. *Clinical Cancer Research*; 4:407-410.
- Takano K, Ogasahara K, Kaneda H, Yamagata Y, Fujii S, Kanaya E, Kikuchi M, Oobatake M, Yutani K (1995).** Contribution of hydrophobic residues to the stability of human lysozyme: calorimetric studies and X-ray structural analysis of the five isoleucine to valine mutants. *Journal of Molecular Biology*; 254:62-76.
- Testa JR, Bellascosa A (2001).** AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 98: 10983-5.
- Thomadaki H, Scorilas A (2010).** BAX (BCL2-associated X protein). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*; 14(4):356-360.
- Tibes R, Kornblau SM, Qiu Y, Mousses SM, Robbins C, Moses T, Carpten JD (2008).** PI3K/AKT pathway activation in acute myeloid leukaemias is not associated with AKT1 pleckstrin homology domain mutation. *British Journal of Haematology*; 140:344-347.
- Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y (2006).** Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast Cancer. *Breast Cancer*; 13(2):137-44.

- Tulsyan S, Chaturvedi P, Singh AK, Agarwal G, Lal P, Agrawal S, Mittal RD, Mittal B (2014).** Assessment of clinical outcomes in breast cancer patients treated with taxanes: multi-analytical approach. *Gene*; 543(1):69-75.
- Uribe J, Hernández C, Menolascino F, Rodríguez J, Istúriz L, Márquez M, Rodríguez R, Uribe J (2010).** Clasificación molecular del cáncer de mama. *Revista Venezolana de Oncología*; 22(2):109-116.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000).** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal*; 346(3): 561-576.
- Wagner A (2005).** Distributed robustness versus redundancy as causes of mutational robustness. *BioEssays*; 27:176-188.
- Wang L, Habuchi T, Takahashi T, Kamoto T, Zuo T, Mitsumori K, Tsuchiya N, Sato K, Ogawa O, Kato T (2002).** No association between HER-2 gene polymorphism at codon 655 and a risk of bladder cancer. *International Journal of Cancer*; 97: 787-790.
- Wang GQ, Bao L, Zhao XX, Zhang J, Nan KJ (2014).** Associations between Fas/FasL polymorphisms and susceptibility to cervical cancer: a meta-analysis. *Tumour Biology*; 35(5):4107-12.
- Wang-Gohrke S, Claude JC (2001).** Re: population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of National Cancer Institute*; 93:1657-1659.
- Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platthiggins A, George WD, Holt S, Myskov M, Spedding A, Barraclough BR, Rudland PS (1991).** The longterm prognostic-significance of c-erbB-2 in primary breast-cancer. *British Journal of Cancer*; 63: 447 - 450.
- Xie D, Shu XO, Deng Z, Wen WQ, Creek KE, Dai Q, Gao YT, Jin F y Zheng W (2000).** Population-based, case control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of National Cancer Institute*; 92:412-417.
- Xu R, Ogino S, Lip V, Fang H, Wu BL (2003).** Comparison of PCR-RFLP with allele-specific PCR in genetic testing for spinal muscular atrophy. *Genetic Testing*; 7:277-281.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001).** Untangling the erbB signalling network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*; 2:127-137.
- Yildiz Y, Yaylim I, Ozkan NE, Arıkan S, Turan S y Kucucuk S (2013).** Bax promoter G (- 248) A polymorphism in a Turkish clinical breast cancer patients: A case-control study (2003). *American Journal of Molecular Biology*; 3:10-16.
- Yonemura Y, Ninomiya I, Tsugawa K, Fushida S, Fujimura T, Miyazaki I, Uchibayashi T, Endou Y, Sasaki T (1998).** Prognostic significance of cerbB-2 gene expression in the

- poorly differentiated type of adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Detection and Prevention*; 22:139– 146.
- Yu Y, Zheng S, Zhang S, Jin W, Liu H, Jin M, Chen Z, Ding Z, Wang L, Chen K (2014).** Polymorphisms of inflammation-related genes and colorectal cancer risk: a population-based case-control study in China. *International Journal of Immunogenetics*; 41 (4):289-97.
- Zha H, Aime´-Sempe´ C, Sato T, Reeds J (1996).** Proapoptotic Protein Bax Heterodimerizes with Bcl-2 and Homodimerizes with Bax via a Novel Domain (BH3) Distinct from BH1 and BH2. *Journal of Biological Chemistry*; 271:7440-7444.
- Zhang N, Li X, Tao K, Jiang L, Ma T, Yan S y Yang Q (2011).** BCL-2 (-938C>A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *BMC Medical Genetics*; 12(1):12-48.
- Zinda MJ, Johnson MA, Paul JD, Horn C, Konicek BW, Lu ZH, Sandusky G, Thomas JE, Neubauer BL, Lai MT, Graff JR (2001).** AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon. *Clinical Cancer Research*; 7(8):2475-9.

ANEXO

ACUERDO VOLUNTARIO
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente documento y teniendo plena capacidad de mis facultades mentales o como tutor legal, *doy mi consentimiento y me ofrezco voluntariamente* para participar de la investigación médica *“Variabilidad genómica y cáncer II: Nuevas tecnologías biomédicas para el estudio de SNPs y metilación” (Proyecto de Investigación Incentivado Código 16Q496)*, bajo la dirección del **Laboratorio de Biotecnología Molecular (BIOTECMOL)** perteneciente a la **Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (UNaM)** y del **Instituto de Biotecnología Misiones (INBIOMIS)** con domicilio en la Ruta Nacional N°12 Km 7 ½ - Campus Universitario de la ciudad de Posadas (CP3300), Provincia de Misiones, Argentina.

Entiendo que este estudio empleará muestras biológicas de sangre y tejido tumoral parafinado para la obtención de ADN genómico total, el cual será utilizado para el estudio de polimorfismos y mutaciones en genes relacionados al cáncer de mama. Sé que la información que sobre mi se obtenga como producto de la participación de este estudio podrá ser empleada en ámbitos científicos para favorecer el adelanto de las ciencias biomédicas bajo la condición de que se preservará el carácter de confidencialidad de mi persona, o de quien represento legalmente, y de cualquier dato vinculante a la identidad de la misma.

Tengo conocimiento que la totalidad de los investigadores responsables de este proyecto están de acuerdo y adoptan los principios éticos, legales y jurídicos para las investigaciones médicas en seres humanos descritas en las normas bioéticas nacionales (*Disp. ANMAT 5330/97*) e internacionales (*Código de Núremberg, Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y sus modificaciones, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos de la UNESCO 11/11/97*), destacando el derecho a la privacidad genética, incluyendo el derecho a prevenir la toma o almacenamiento de muestras corporales para información genética sin el voluntario consentimiento informado.

Dejo explícito que se me ha puesto en conocimiento del significado de mi participación voluntaria respecto de la duración y finalidad del estudio, de los métodos diagnósticos a ser empleados y del alcance de los resultados a ser obtenidos. Así mismo he tenido la oportunidad de realizar preguntas referidas a este estudio y las respuestas recibidas han sido todas satisfactorias.

Sé que dispongo de plena libertad de renunciar mi participación en este estudio en el momento que así lo desee, debiendo por ello notificar por escrito al Dr. Pedro Darío Zapata,

Director del Proyecto a la dirección postal previamente citada. Sé que mi exclusión del presente estudio se realizará sin cuestionamiento alguno y se concretará una vez que la mencionada persona se notifique de mi decisión. La participación en el presente estudio no implicará gratificación financiera alguna.

Habiendo ratificado lo anterior firmo el presente documento:

Voluntario

Apellido y Nombre:	
Firma:	Lugar y Fecha
Aclaración:	DNI:
Dirección:	

Testigo

Doy fe de la participación Voluntaria de: (Apellido y Nombre del voluntario), de la originalidad de su firma y de sus datos personales.

Firma:	Lugar y Fecha
Aclaración:	DNI:

Padre, Tutor o Responsable Legal *(Si el voluntario es menor de 21 años, o la persona se ve imposibilitada de dar su consentimiento por escrito)*

Autorizo la participación Voluntaria de: (Apellido y Nombre del voluntario)

A participar del presente estudio.

Firma:	Lugar y Fecha
Aclaración:	DNI: